

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Microbiología I**



**TESIS DOCTORAL**

**Esclerosis múltiple: encrucijada entre genética, inmunología y virología**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Belén de la Hera Hernanz**

Directoras

Elena Urcelay García  
Jezabel Varadé López

**Madrid, 2017**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Microbiología I



**Esclerosis múltiple: encrucijada entre genética, inmunología y virología**

Memoria presentada por Belén de la Hera

para optar al grado de doctor

Madrid 2016





El siguiente trabajo ha sido posible gracias a la financiación del Fondo de Investigaciones Sanitarias (FEDER-FIS) del Instituto de Salud Carlos III (FI11/00560), (FIS PI10/01985) y (FIS PI13/0879)



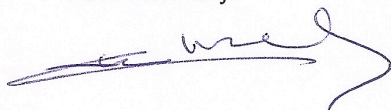
Madrid, 24 de Octubre de 2015

Las doctoras Elena Urcelay y Jezabel Varadé, Investigadoras del Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos de Madrid, IdISSC, CERTIFICAN que el trabajo de investigación titulado "*Esclerosis múltiple: encrucijada entre genética, inmunología y virología*" ha sido realizado bajo su dirección por Belén de la Hera para optar al grado de Doctora, en la UGC de Inmunología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

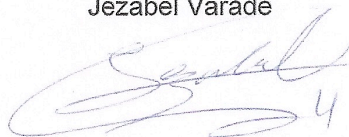
Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado.

Las Directoras de la Tesis:

Elena Urcelay



Jezabel Varadé





# ÍNDICE

ÍNDICE .....	1
ABREVIATURAS .....	4
SUMMARY .....	6
RESUMEN .....	6
INTRODUCCIÓN .....	20
1. 1. .... Esclerosis Múltiple	20
1.1 Datos epidemiológicos de la EM .....	21
1.2 Factores ambientales .....	21
1.3 Formas clínicas de la EM .....	22
1.4 Patogenia de la EM .....	23
Daño axonal .....	24
1.5 Tratamiento de la EM .....	26
Natalizumab .....	28
1.6 Modelos animales de EM .....	29
2. 2. .... Estudio de la Genética de la EM	31
2.1 Estudios previos a los GWAS .....	32
2.2 Estudios de asociación del genoma completo .....	32
2.3 Heredabilidad perdida EM .....	33
2.4 Genes en la región HLA .....	35
3. 3. .... HERVs	38
3.1 Introducción .....	38
3.2 Posibles mecanismos de expresión de los HERVs .....	41
3.3 Mecanismos de patogenicidad de los retrovirus endógenos .....	43
3.4 HERVs y EM .....	46
3.5 Familias de HERVs estudiadas .....	48
3.5.1 HERV-W .....	48
3.5.2 HERV-K .....	53
3.5.3 HERV-Fc1 .....	55
OBJETIVOS .....	58
TRABAJOS .....	60
DISCUSIÓN .....	112
CONCLUSIONES .....	122
BIBLIOGRAFÍA .....	124







## ABREVIATURAS

Ac: Anticuerpo  
ADN: Ácido desoxirribonucleico  
ADNc: ADN complementario o ADN copia  
AEMPS: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (*Spanish Agency for Medicine and Health Products*)  
AG: Acetato de Glatirámico  
AR: Artritis Reumatoide  
ARN: Ácido ribonucleico  
ARNm: ARN mensajero  
ARNt: ARN de transferencia  
ARNlinc: Grandes ARNs no codificantes intercalados  
ATP: Trifosfato de adenosina  
BHE: Barrera hematoencefálica  
BTK: Kinasa tirosina de Bruton (*Bruton tyrosine kinase*)  
CFB: Factor de complemento B (*Complement factor B*)  
cGAS: Sensor llamado *cyclic GMP-AMP synthase*  
CFA: Adyuvante completo de Freud (*Compleat Freund adjuvant*)  
CI: Intervalo de confianza  
CIS: Síndrome clínicamente aislado (*Clinically isolated syndrome*)  
CK: Citoquinas  
CPA: Célula presentadora de antígeno  
CPO: Célula precursora de oligodendrocitos  
Cr: Cromosoma  
CREBL1: Proteína de unión 1 al elemento de respuesta CAMP  
CRM1: Proteína transportadora núcleo-citoplasma, también llamada Exportina 1  
C2: Componente del complemento 2  
C4A: Componente del complemento 4A  
C4B: Componente del complemento 4B  
EAE: Modelo de encefalomiелitis experimental autoinmune (*Experimental autoimmune encephalomyelitis*)  
EDSS: Escala expandida del estado de discapacidad (*Expanded Disability Status Scale*)  
ELA: Esclerosis lateral amiotrófica  
EM: Esclerosis Múltiple  
EMA: Agencia Europea de Medicamentos (*European Medicines Agency*)  
ENCODE: *Encyclopedia of DNA elements*  
env: Gen que codifica para la glicoproteína de la envuelta  
Env: glicoproteína de la envuelta  
eQTLs: *Expression quantitative trait loci*  
ERV: Retrovirus endógenos (*Endogenous retroviruses*)  
FDA: Administración de Medicamentos y de Alimentos de Estados Unidos (*Food and Drug Administration*)  
gag: Gen que codifica para las proteínas necesarias para el ensamblaje viral  
GWAS: Estudios de asociación de barrido genómico (*Genome-Wide Association Studies*)  
HCSC: Hospital Clínico San Carlos  
HDAC-1: Enzima desacetilasa de histonas 1  
HERV: Retrovirus endógenos humanos (*Human endogenous retroviruses*)  
HHV6: Herpesvirus humano 6 (*Human herpesvirus 6*)  
HLA: Antígeno Leucocitario Humano (*Human Leukocyte Antigen*)  
HTLV-1: Virus linfotrófico de células T de tipo 1 (*Human T-lymphotropic virus 1*)  
IE: Genes tempranos inmediatos (immediate-early)  
IFN: Interferón  
IL- : Interleuquina  
IMSGC: Consorcio Internacional de Genética de Esclerosis Múltiple (*International Sclerosis Genetics Consortium*)  
ITAM: Motivo inmunorreceptor de activación basado en tirosinas (*Immunoreceptor tyrosine-based activation motif*)

JCV: Virus John Cunningham  
 KA: Ácido Kainico  
 LCR: Líquido cefalorraquídeo  
 LMB: Leptomicina B  
 LMP: Proteína latente de membrana (*Latent membrane protein*)  
 LM7: Cultivo de células leptomeníneas  
 LTR: Repetición terminal larga (*Long terminal repeat*)  
 MAF: Polimorfismos con muy baja frecuencia alélica (*Minor allele frequency*)  
 MAVS: Adaptador mitocondrial antiviral (*Mitochondrial antiviral signaling protein*)  
 MFs: Macrófagos  
 MHC: Complejo principal de histocompatibilidad (*Major Histocompatibility Complex*)  
 MICB: Polipéptido de MHC de clase I relacionado con la secuencia B  
 MOG: glicoproteína de mielina del oligodendrocito (*Myelin oligodendrocyte glycoprotein*)  
 MSH5: Homólogo de mutS 5  
 MSRV: Retrovirus asociado a la esclerosis múltiple (*Multiple sclerosis associated-retrovirus*)  
 NES: Secuencia de exportación nuclear (*Nuclear export signal*)  
 NF-Kb: Factor de transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)  
 nt: nucleótidos  
 OLG: Oligodendrocitos  
 OR: Odds Ratio  
 ORF: Marco abierto de lectura (*Open Reading Frame*)  
 OR2H2: Receptor olfatorio 2H2  
 pb: pares de bases  
 PBMC: Células mononucleares de sangre periférica (*Peripheral blood mononuclear cell*)  
 PBS: *Primer binding site* o sitio de inicio de la transcripción  
 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain reaction*)  
 PML: Leucoencefalopatía Multifocal Progresiva (*Progressive multifocal leukoencephalopathy*)  
 pol: Gen que codifica para las enzimas necesarias para la replicación viral  
 PP: Primaria progresiva  
 PR: Primaria recurrente  
 PRR: Receptores de reconocimiento de patrones  
 RIG-1: Sensor de ARN llamado *retinoic acid-inducible gene-1*  
 RR: Remitente recurrente  
 RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (*Reverse transcription polymerase chain reaction*)  
 SAg: Superantígeno  
 SCID: Modelo animal de inmunodeficiencia combinada severa (*Severe Combined Immunodeficiency*)  
 SINE: Inhibidores selectivos de la exportación nuclear (*Selective inhibitors of nuclear export*)  
 SNC: Sistema nervioso central  
 SNP: Polimorfismo de un solo nucleótido (*Single nucleotide polymorphism*)  
 SP: Secundaria progresiva  
 SKIV2L: Helicasa SKIV2L  
 SU: Subunidad de superficie de la proteína Env  
 TCR: Receptor del linfocito T (*T cell receptor*)  
 Th: Linfocito T colaborador (*T helper cell*)  
 TI-: Antígeno timo-independiente  
 TLR: Receptor de tipo Toll (*Toll like receptor*)  
 TNF: Factor de necrosis tumoral (*Tumor necrosis factor*)  
 Treg: Linfocito T regulador  
 VEB: Virus de Epstein Barr  
 VPP: Valor Predictivo Positivo  
 WTCCC2: Consorcio Caso Control Wellcome Trust 2 (Wellcome Trust Case Control Consortium2)  
 (3U): Región 3' única de los LTRs  
 (R): Región repetida de los LTRs  
 (5U): Región única 5' de los LTRs

## SUMMARY

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, progressive disease characterized by inflammation in the CNS accompanied by demyelination, axonal damage and progressive neurologic dysfunction. It is a complex disease, originating from the interaction of genetic and environmental factors. Its incidence seems to be increasing and currently affects 2.3 million people in the world. However, many aspects of its pathogenesis are still poorly understood. GWAS have not completely explained the MS genetic background, although including the results of the ImmunoChip Project a total of 110 single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been associated with MS susceptibility. Even considering the strongest risk factor, the HLA-DRB1\*15:01 allele, each SNP has a modest effect and all together are able to explain only 20 to 28% of the sibling recurrence risk. Therefore, a large proportion of the MS heritability still remains to be elucidated.

Human endogenous retroviruses (HERVs) are “genetic parasites” of the vertebrate genome. They come from ancestral infections of exogenous retroviruses that infected the germline and began to be transmitted to next generations in a Mendelian form. Currently, they comprise nearly 8% of the human genome. Usually, they are not expressed because they have been reduced to inactive or defective copies. However, a reactivation of specific HERVs has been observed associated with different types of cancer, autoimmune diseases such MS, rheumatoid arthritis (RA), psoriasis or systemic lupus erythematosus (SLE); and other diseases like schizophrenia.

MSRV (Multiple sclerosis associated-retrovirus), founder of HERV-W family, is the endogenous retrovirus most strongly associated with MS since it was described in 1989. The MSRV presence in serum and CSF has been correlated with the clinical progression, severity and prognosis of MS. In spite of that, its chromosomal origin is still unknown.

The HERV-W family is one of the most currently associated families with MS, but other families, like HERV-K and HERV-Fc, had also been related with the disease. In the HERV-K18 case, three different variants of the env gene exist (18.1-18.3), all of them encode an HERV-K18 Env protein, which acts as a superantigen stimulating T cells. It has been previously described that the genetic variation of HERV-K18 superantigen could influence MS susceptibility, limiting this association to the HERV-K18.3 haplotype. In the HERV-Fc case, an increased HERV-Fc1 RNA expression has been found in the plasma of MS patients, and one SNP (rs391745) has been associated with a higher susceptibility to MS development.

Limited knowledge of MS etiopathogenesis has hampered the development of new therapies. Despite of the advances made in the last decade and the appearance of new and more specific treatments, curative treatment for MS does not exist. In fact, new treatments like Natalizumab (2004) is shown to be effective to reduce the number of exacerbations, but it has not replaced the first line treatment (IFN $\beta$  and Glatimer Acetate) due to its potentially lethal adverse effects. In addition to the risk of developing a progressive multifocal leukoencephalopathy, a higher risk of infections, and the risk of hypersensitivity reactions, are included among the main adverse

effects of Natalizumab. Thereby, this treatment applies when the first line treatment is not effective, or for those patients with an aggressive onset of the disease.

One of the pathologic features of MS is the axonal damage, characterized by disruption of the cytoskeleton and impaired axonal transport. In some pathologic conditions, an accumulation of nuclear proteins in the cytoplasm interferes with axonal transport and mitochondrial movement. Thereby, it has been hypothesized that the transport protein, Exportin 1 (XPO1/CRM1), could play an important role in axonal damage.

### Hypothesis

HERVs are part of human repetitive regions not studied in the GWAS and previously considered “junk DNA”. We currently know that these sequences may play an important role in certain autoimmune diseases, both being transcribed and working as regulatory elements. Therefore, HERVs could explain part of the MS missing heritability, be implicated in the pathogenesis of the disease, and constitute potential therapeutic targets.

Regarding MS treatment, one adverse effect of Natalizumab therapy is the risk of hypersensitivity reactions, mediated by an inappropriate activation of T cells. Therefore, an association could exist between different HLA alleles and the susceptibility to develop a hypersensitivity reaction. Furthermore, regarding the search for new MS therapies, we considered the possibility that Exportin dysregulation may be one of the factors leading to axonal damage. In this way, the CRM1 inhibition could avoid the accumulation of nuclear proteins into the cytoplasm in pathologic conditions, acting by a neuroprotector mechanism.

### Aims

1. To elucidate the chromosomal origin of MSRV-type viral particles, with the genomic study of the MSRV-type *env* copies located on chromosomes X and 20, as they are the most conserved insertions.
2. To evaluate the role of HERV-K18 in autoimmune diseases susceptibility.
3. To study the role of HERV-Fc1 in MS susceptibility.
4. To analyze the relationship between class I and II HLA alleles and the susceptibility to develop hypersensitivity reactions to Natalizumab.
5. To study the CRM1 inhibitor, KPT350, as a potential treatment to protect against the axonal damage observed in demyelinating diseases.

### Materials and methods

1. To elucidate the chromosomal origin of MSRV-type viral particles.

*In silico* analyses using the HERV-W *env* described sequence (AF331500) showed that only 9 of the 261 possible insertions of MSRV-type *env* had an open reading frame (ORF). The *env* sequences from chromosomes X (1428 bp) and 20 (1419 bp), which share open reading frames with the highest homology to the physiological syncytin (1614 bp), were specifically amplified by

PCR. The amplicons were divided into overlapping fragments of 200pb to use them in the search of new polymorphisms by High Resolution Melting (HRM) curves. Finally, TaqMan assays were used to genotype the identified SNPs. A total of 1669 patients and 1458 controls were genotyped in the Ch.X study, and a total of 668 patients and 678 controls in the Ch.20 study. An expression study by qPCR was also carried out in both studies. Statistical analyses were performed with SPSS v 17.0 software.

## 2. To evaluate the role of HERV-K18 in autoimmune disease susceptibility.

After specific amplification of an 8 Kb DNA fragment including the HERV-K18 *env* coding sequence at 1q22.1, samples were genotyped by using two TaqMan assays that cover the three possible haplotypes: a Y/C change at position 97 and a W/Stop change at position 154. The case-control study included 942 MS patients, 462 RA patients, and 601 controls, all of them from HCSC. The meta-analysis including the previously published data analyzed a total of 2656 autoimmune disease patients, and 2016 controls. Statistical analyses were performed with SPSS v 17.0 and Revman 5.0 software.

## 3. To study the role of HERV-Fc1 in MS susceptibility.

The SNP rs391745 was genotyped by TaqMan assays in three different cohorts, with a total of 2473 patients and 3031 controls included. Finally, a meta-analysis was performed with the data previously published, gathering a total of 4162 MS patients and 5840 controls. Statistical analyses were performed with SPSS v 17.0 and Revman 5.0 software.

## 4. To analyze the association between class I and II HLA alleles and the susceptibility to develop hypersensitivity reactions to Natalizumab.

A total of 54 MS patients treated with Natalizumab that suffered hypersensitivity reactions and 65 MS patients treated with Natalizumab that did not suffer these reactions were studied. The samples were genotyped by Luminex technology, and the 3 cohorts were compared in a meta-analysis. Statistical analyses were performed with SPSS v 17.0 and Revman 5.0 software.

## 5. To study the CRM1 inhibitor, KPT350, as a potential protective treatment against the axonal damage observed in demyelinating diseases

Both drugs (KPT-279, KPT-350) and the vehicle control compounds (Pluronic® and PVP K-29/32) were proportionated by Karyopharm Therapeutics Inc. Their therapeutic potential was studied in 3 different animal models: 1) experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by immunization of C57BL/6J mice with myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG<sub>35-55</sub>) in Freund complete adjuvant (FCA) together with Bordetella Pertussis injection; 2) focal EAE model by immunization of C57BL/6J mice with MOG<sub>35-55</sub> in FCA together with injection of TNF $\beta$  and INF $\gamma$  directly into the spinal cord, and 3) a neurotoxicity model induced by Kainic Acid (KA) injection. The mice were periodically evaluated using different scoring systems, and finally sacrificed. For RNA extraction and qPCR, the spleen and the spinal cord from each mouse were recovered

and quickly frozen in dry ice. However, for immune-histochemical techniques, mice were perfused and brains, spleens and spinal cords were recovered. Primary cell cultures were obtained from cerebral cortices of rat puppies and cultivated according to the McCarthy and Vellis modified protocol. In order to identify the molecules that could have a protector effect, a proteomic screening was carried out in neurons treated with KPT-350. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5.0.

## Results and discussion

### 1. To elucidate the chromosomal origin of MSRV-type viral particles

We identified three SNPs [rs6622139 (T/C), rs6622140 (G/A), and rs1290413 (G/A)] in the copy located in Chr.X, and two SNPs [rs974293065 (T/C) and rs974293066 (T/G)] in the copy located in Chr.20. The SNP rs6622139\*T was associated in women with MS susceptibility and severity, and it was also associated with higher MSRV-like *env* levels of expression (Mann–Whitney U test:  $p=0.003$ ), while the two polymorphisms found in chromosome 20 did not show evidence of association. Therefore, our results pointed to the insertion in chromosome X, and not the one in chromosome 20, as an origin of MSRV.

### 2. To evaluate the role of HERV-K18 in autoimmune diseases susceptibility.

Significant differences for both SNP were found in the EM cohort when the patients were stratified by the main susceptibility factor HLA-DRB1\*1501 [97Y/C:  $p=0.02$ ; OR(95%CI)=1.5(1.04-2.17) and 154W/Stop:  $p=0.001$ ; OR(95%CI)=1.6(1.9-2.16)]. The meta-analysis including the previously published data showed association between the HERV-K 18.3 haplotype (97Y/154W, SNP1\*A-SNP2\*G) and autoimmune diseases susceptibility ( $p=0.0008$ , OR (95%CI)=1.22(1.09-1.38). In conclusion, we confirm the association between HERV-K18 and the risk of development of autoimmune diseases, delimiting this association to HERV-K18.3 haplotype.

### 3. To study the role of HERV-Fc1 in MS susceptibility.

The SNP rs391745 showed significant differences in two out of the three studied cohorts, and the meta-analysis corroborated the previously described association between the C-allele carriers and the MS susceptibility [rs391745 C-allele carriers:  $p_{M-H}=0.0005$ ; OR<sub>M-H</sub>(95%CI)=1.27(1.11-1.45)]. When the analysis is restricted to remittent, recurrent and secondary progressive forms, a slight increase of the strength of association was noted [ $p_{M-H}=0.0003$ ; OR<sub>M-H</sub>(95%CI)=1.32(1.14-1.53)]. In summary, we corroborated the association between HERV-Fc1 and MS susceptibility.

### 4. To analyze the association between class I and II HLA alleles and the susceptibility to develop hypersensitivity reactions to Natalizumab.

The study of the 119 treated patients showed a significant increment of the HLA-DRB1\*13 and HLA-DRB1\*14 alleles in patients who had suffered hypersensitivity reactions to Natalizumab

[ $p_{M-H}=3\times 10^{-7}$ ;  $OR_{M-H}(95\%CI)=8.96(3.40-23.64)$ ], with a positive predictive value (PPV) of 82%. On the other hand, carriers of the *HLA-DRB1\*15* allele are protected from the development of these reactions, as this allele was significantly increased in patients who did not show hypersensitivity symptoms [ $p_{M-H}=6\times 10^{-4}$ ;  $OR_{M-H}(95\%CI)=0.2(0.08-0.50)$ ], with a PPV of 81%. These data could be very useful to identify patients with an increased risk of suffering hypersensitivity reactions to Natalizumab treatment.

5. To participate in the study of CRM1 inhibitor, KPT350, as a potential protective treatment against the axonal damage observed in demyelinating diseases

The study shows a pre-clinical efficacy demonstrated in three different animal models (EAE, focal EAE and KA models), supporting the role of nuclear cargo movement as important in the neurodegeneration process. Neuroprotection involves immune and neuronal cells. With regard to the role in immunomodulation, the CRM1 inhibitors reduce the inflammatory load by nuclear retention of cellular cycle inhibitors, like p27. On the other hand, a direct role in neuroprotection is due to the improvement in transport and mitochondrial function, avoiding the disruption of cytoskeleton integrity. This could be due to the nuclear retention of “axono-toxic” molecules like TAU, and “protective” molecules performing antioxidant defense, like NFR2.

## **Conclusions**

1. Three SNPs (rs6622139, rs6622140 and rs1290413) and two mutations have been described in the HERV-W copy located on Ch.X. One of these SNPs, rs6622139\*T is associated with MS development susceptibility and disease severity in women, pointing to this insertion being the possible chromosomal origin of MSRV-type Env.
2. Two SNPs in the HERV-W copy located on Ch.20 (NCBI\_ss#SNP1: 974293065 and SNP2: 974293066) have been identified and we discard this copy as a potential chromosomal origin of MSRV-type Env
3. The association between HERV-K18 and the risk of development of autoimmune diseases has been corroborated, delimiting this association to HERV-K18.3 haplotype.
4. The previously described association between rs391745, located near the HERV-Fc1 insertion, and MS development susceptibility has been validated, delimiting this association to non-progressive forms of the disease.
5. The genotyping of the HLA-DRB1 region previous to Natalizumab treatment would help to identify patients with an increased risk of developing hypersensitivity reactions to this treatment. A significant increase of the HLA-DRB1\*13 and HLA-DRB1\*14 alleles in the patients who had suffered hypersensitivity reactions was observed, and conversely, the HLA-DRB1\*15 allele seems to be associated with a protective effect.
6. Strategies aimed at nuclear export inhibition could be effective in reducing the axonal damage in neurodegenerative diseases like MS. Oral administration of CRM1 inhibitors in preclinical murine models of demyelination significantly attenuate disease progression, by

reducing the immune cell proliferation and by preserving the cytoskeletal integrity even in demyelinated axons.



## RESUMEN

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica progresiva caracterizada por inflamación en el sistema nervioso central acompañado por desmielinización, daño axonal y disfunción neurológica progresiva. Se trata de una enfermedad compleja, cuya incidencia parece haber incrementado en los últimos tiempos, afectando actualmente a 2.3 millones de personas en el mundo. Sin embargo, muchos de los aspectos de su etiopatogenia continúan sin ser conocidos hoy en día. Es comúnmente aceptado que surge de la interacción de una serie de factores ambientales en individuos genéticamente susceptibles. Los estudios de barrido genómicos (GWAS) junto con el proyecto InmunoChip han permitido identificar un total de 110 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) asociados con la susceptibilidad a desarrollar EM. Pero la realidad es que, a excepción del *HLA-DRB1\*15:01*, cada uno de ellos posee un efecto modesto, por lo que el conjunto solo es capaz de explicar de un 20 a un 28% del riesgo recurrente en hermanos, quedando todavía una gran parte de la heredabilidad sin explicar.

Los retrovirus endógenos humanos (HERVs) son “parásitos genéticos” del genoma de los vertebrados. Proviene de una infección ancestral por retrovirus exógenos, que tras infectar la línea germinal del individuo y sufrir un proceso de endogenización, han pasado a heredarse de forma mendeliana. Actualmente componen el 8% del genoma humano. Normalmente no se expresan porque consisten en copias defectivas o inactivas, sin embargo, se ha observado una reactivación de HERVs específicos asociada con varios tipos de cáncer, enfermedades autoinmunes como la EM, la artritis reumatoide (AR), la psoriasis o el lupus eritematoso sistémico; y otras enfermedades como la esquizofrenia.

MSRV (*Multiple sclerosis associated-retrovirus*), fundador de la familia HERV-W, es el retrovirus endógeno asociado de manera más notable a la EM. Desde que se descubriese en 1989, son muchos los estudios que lo relacionan con la enfermedad: se ha descrito la presencia de la proteína Env de tipo MSRV en lesiones desmielinizantes agudas de pacientes con EM, así como un mayor número de copias de ADN o una alta prevalencia de secuencias de ARN de tipo MSRV en el suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM comparado con pacientes de otras enfermedades neurológicas o controles de todos los grupos étnicos. Además, la presencia de MSRV en suero y LCR correlaciona con la progresión clínica, severidad y pronóstico de la enfermedad. Pese a ello, su origen cromosómico está aún por determinar.

Aunque la familia de HERV-W es una de las que más se ha relacionado con la EM, también se han asociado otras familias, como HERV-K y HERV-Fc. En el caso de HERV-K18, existen 3 variantes distintas del gen *envelope* (18.1-3) todas ellas codificantes para una proteína Env HERV-K18 que actúa como un superantígeno estimulando a las células T. Ha sido previamente descrito que la variación genética en el superantígeno Env HERV-K18 podía modificar la

susceptibilidad a EM, limitando esta asociación al haplotipo HERV-K18.3. En el caso de HERV-Fc1, se ha encontrado una expresión incrementada de ARN de HERV-Fc1 en plasma de pacientes con EM, y se asoció un SNP (rs391745) con una mayor susceptibilidad a padecer EM.

El desconocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad ha dificultado el desarrollo de las terapias dirigidas frente a la EM. A pesar de los grandes avances realizados durante esta última década con la aparición de nuevos tratamientos más dirigidos y/o de administración oral que mejoran la calidad de vida de los pacientes, actualmente no existe un tratamiento curativo de la enfermedad. De hecho, a pesar de que estos nuevos medicamentos como el Natalizumab (2004) son efectivos en la disminución de la frecuencia de los brotes, no han llegado a desplazar al IFNbeta o al Acetato de Glatirámico como medicamentos de primera línea debido a sus efectos adversos. Entre ellos destacan el riesgo a desarrollar una leucoencefalopatía multifocal progresiva y la aparición de reacciones de hipersensibilidad en el caso del Natalizumab; por lo que este tratamiento queda reservado para pacientes donde aquellos no han resultado eficaces, o pacientes que comienzan con un inicio agresivo de la EM.

Una de las características patológicas de la EM es el daño axonal, caracterizado por la disrupción del citoesqueleto y por un transporte alterado. En condiciones patológicas, la acumulación anormal de proteínas nucleares en el citoplasma interfiere con el transporte axonal y el movimiento mitocondrial. Por esta razón, se ha hipotetizado que la proteína transportadora Exportina 1(XPO1/CRM1) podría jugar un papel importante en el daño axonal.

### **Hipótesis**

Los HERVs forman parte de las regiones repetitivas del genoma, antiguamente consideradas como “ADN de unión o basura”, que no han sido estudiadas en los GWAS. Sin embargo, hoy en día se sabe que estas secuencias pueden tener un papel importante en la patología de ciertas enfermedades, tanto transcribiéndose como funcionando como elementos reguladores.

Los HERVs, por tanto, podrían explicar parte de la “heredabilidad perdida” asociada a la EM, estar implicados en la patogenia de la enfermedad, y constituir dianas terapéuticas potenciales.

Con respecto al tratamiento de la EM, uno de los efectos adversos del Natalizumab recae en la aparición de reacciones de hipersensibilidad. Estas reacciones están mediadas por una activación inapropiada de células T, por lo que parece factible que pueda existir alguna asociación entre distintos alelos HLA y la susceptibilidad a desarrollar dichas reacciones.

Por último, en base a la búsqueda de nuevos tratamientos, nos planteamos si la desregulación del transportador nuclear Exportina podría ser una de las causas conducentes a daño axonal. Si esto fuese así, su inhibición podría impedir la acumulación de proteínas nucleares en el citoplasma en condiciones patológicas y funcionar como un mecanismo protector frente al desarrollo de daño axonal.

## Objetivos

1. Dilucidar el origen cromosómico de las partículas virales de tipo MSRV: estudio genómico de las copias más conservadas de HERV-W, situadas en los cromosomas X y 20, como posibles candidatas a ser origen de Env MSRV.
2. Evaluar el papel del HERV-K18 en la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes.
3. Estudiar el papel del HERV-Fc1 en la susceptibilidad al desarrollo de la EM.
4. Analizar la relación de los alelos HLA de clase I y II con la susceptibilidad al desarrollo de reacciones anafilácticas frente al Natalizumab.
5. Estudio del inhibidor del transportador nuclear CRM1, KPT350, como posible tratamiento protector frente al daño axonal observado en las enfermedades desmielinizantes.

## Materiales y métodos

1. Dilucidar el origen cromosómico de las partículas virales de tipo MSRV: estudio genómico de las copias de HERV-W más conservadas, situadas en los cromosomas X y 20, como posibles candidatas a ser origen de Env MSRV.

El análisis *in silico*, utilizando la secuencia descrita de *env* de HERV-W (AF331500), mostró que únicamente 9 de las 261 posibles inserciones de *env* de tipo MSRV poseían un marco abierto de lectura (ORF). Se amplificaron mediante PCR específicas las secuencias de *env* HERV-W tanto del cromosoma X como del cromosoma 20, al ser las copias más conservadas desde las que se encontró expresión. Dichos amplicones fueron divididos en fragmentos solapantes de aproximadamente 200pb para la búsqueda de posibles polimorfismos mediante el uso de curvas de desnaturalización. Se estudió la frecuencia de los SNPs encontrados a través del uso de sondas TaqMan, previa amplificación específica de la copia genómica de interés. En el estudio de la copia del CrX fueron genotipados un total de 1669 pacientes de EM y 1458 controles procedentes del Hospital Clínico San Carlos (HCSC) y del Hospital Virgen Macarena de Sevilla. Y en el caso del Cr20, se genotiparon 668 pacientes y 678 controles sanos todos ellos procedentes del HCSC, pero no se amplió el estudio a una segunda cohorte al no encontrar diferencias significativas. Así mismo, también se realizó en ambos casos un estudio de expresión mediante RT-PCR. Para el diseño de los primers se utilizó el programa Primer3, y para los análisis estadísticos el programa SPSS v 17.0.

2. Evaluar el papel del HERV-K18 en la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes

El estudio caso-control incluyó un total de 942 pacientes de EM, 462 de AR, y 601 controles procedentes del HCSC. Se amplificó mediante PCR específica un fragmento de ADN de 8 kb donde se encuentra la secuencia codificante de *env* de HERV-K18 en el cromosoma 1, y se llevó a cabo el genotipado de las muestras mediante ensayos TaqMan. Para ello se utilizaron 2 SNPs distintos, un cambio Y/C en la posición 97 y otro cambio W/Stop en 154, que usados conjuntamente cubrían los 3 posibles haplotipos de HERV-K18. Para el meta-análisis incluimos los datos previamente publicados, con un total de 2656 pacientes de enfermedades

autoinmunes y 2016 controles. Los análisis estadísticos fueron realizados con los programas SPSS v 17.0 and Revman 5.0.

### 3. Estudio del papel del HERV-Fc1 en la susceptibilidad al desarrollo de la EM

Se realizó el genotipado del SNP rs391745, situado cerca del locus de HERV-Fc1, mediante el uso de sondas TaqMan, utilizando nuestra cohorte y dos cohortes adicionales del Norte y Sur de España, hasta conseguir un total de 2473 pacientes y 3031 controles. Posteriormente se realizó un meta-análisis incluyendo dichas cohortes como tres cohortes independientes, e incorporando los datos previamente publicados de cohortes Noruegas y Danesas, con un total de 4162 pacientes de EM y 5840 controles. Los análisis estadísticos se realizaron con los programas SPSS v 17.0 y Revman 5.0.

### 4. Estudio del posible efecto de los alelos HLA de clase I y II en relación con la susceptibilidad al desarrollo de reacciones anafilácticas frente al Natalizumab.

Se seleccionaron 54 pacientes (33 franceses, 16 españoles y 5 alemanes) de EM tratados con Natalizumab que hubiesen experimentado una reacción anafiláctica o anafilactoide en las 2h siguientes a la administración del tratamiento entre la segunda y la décimo primera sesión, y 65 muestras (30 francesas, 32 españolas y 3 alemanas) de pacientes que no mostraron reacciones de hipersensibilidad tras el tratamiento. Se realizó el genotipado HLA de clase I y de clase II de todas las muestras mediante tecnología Luminex, y se compararon como tres cohortes independientes a través de la realización de un meta-análisis. Los análisis estadísticos se realizaron con los programas SPSS v 17.0 y Revman 5.0.

### 5. Estudio del inhibidor del transportador nuclear CRM1, KPT350, como posible tratamiento protector frente al daño axonal observado en las enfermedades desmielinizantes

Tanto los fármacos, KPT-276 y KPT-350, como los componentes del vehículo control, Pluronic® F-68 y PVP K-29/32, fueron proporcionados por Karyopharm Therapeutics Inc. Dichos compuestos fueron estudiados en 3 modelos animales distintos: 1) modelo de encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE), inmunizando ratones C57BL/6J con la glicoproteína de mielina del oligodendrocito (MOG<sub>35-55</sub>) en adyuvante completo de Freund junto con una inyección de *Bordetella pertussis*; 2) modelo de EAE localizado donde, en vez de inyectarlos con *Bordetella pertussis*, se llevó a cabo la inyección de una solución de INF $\gamma$  y TNF $\beta$  directamente en la médula espinal, y 3) un modelo de neurotoxicidad inducida por la inyección de ácido kaínico (KA). Dichos ratones fueron evaluados periódicamente usando diferentes escalas y finalmente sacrificados. Para la extracción de ARN y la realización de q-PCR, se extrajo el bazo y la médula espinal de cada uno de los ratones, y las muestras fueron congeladas rápidamente en hielo seco. Sin embargo, para la realización de técnicas inmunohistoquímicas, los ratones fueron perfundidos recuperando el cerebro, bazo y médula espinal de cada uno de ellos para su posterior inclusión en OCT y corte en criostato. Para los estudios realizados con cultivos celulares, se utilizaron cultivos neuronales primarios obtenidos a partir del córtex e hipocampo de embriones obtenidos de ratas Sprague-Dawley o ratones

hembra C57/BL6J preñadas, y cultivos de oligodendrocitos obtenidos a partir del córtex de crías de rata de 1 a 3 días y cultivados según el procedimiento de McCarthy y de Vellis modificado. También fue llevado a cabo un screening proteómico de las neuronas tratadas con KPT-350 para identificar las moléculas que pudiesen explicar el efecto neuroprotector. Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism 5.0.

## Resultados y discusión

### 1. Dilucidar el origen cromosómico de las partículas virales de tipo MSRV: estudio genómico de las copias de HERV-W más conservadas, situadas en el CrX y Cr20, como posibles candidatos de origen de Env MSRV.

En el caso de la copia situada en Xq22.3, identificamos 3 SNPs rs6622139 (T/C), rs6622140 (G/A) y rs1290413 (G/A). El estudio caso-control mostró una asociación significativa del SNP rs6622139 (T/C) con la susceptibilidad a desarrollar EM ( $\chi^2$ ;  $p=0.004$ ; OR (95%CI)=0.50 (0.31-0.91), y con la severidad de la enfermedad, ya que las mujeres con genotipo CC presentaron puntuaciones significativamente menores en la escala de severidad de la EM (MSSS por sus siglas en inglés) que las portadoras de los genotipos CT (U-Mann-Whitney;  $p=0.039$ ) o TT (U-Mann-Whitney;  $p=0.031$ ). En cuanto a la expresión, rs6622139\*T se asoció con una mayor expresión de MRSV (U-Mann-Whitney;  $p=0.003$ ).

Con respecto al locus HERV-W situado en el Cr20, identificamos 2 SNPs [rs974293065 (T/C) y rs974293066 (T/G)], pero ni el estudio caso-control ni el estudio de expresión mostraron diferencias significativas entre enfermos y pacientes. Por tanto, nuestros resultados apoyan la idea de que la copia del tipo *env* MSRV situada en el locus Xq22.3 podría tener papel en la patogénesis de la EM, mientras que descartamos el cromosoma 20 como origen genómico de *env* MSRV.

### 2. Evaluación del papel del HERV-K18 en la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes

En relación a nuestra cohorte de EM, encontramos diferencias significativas para ambos SNPs cuando los pacientes fueron estratificados por el factor de susceptibilidad HLA-DRB1\*15:01 [97Y/C  $p=0.02$ ; OR(95%CI)=1.5(1.04-2.17) y 154W/Stop:  $p=0.001$ ; OR(95%CI)=1.6(1.9-2.16)]. En la cohorte de AR no encontramos ninguna asociación significativa, sin embargo, al realizar el meta-análisis conjunto incorporando los datos sobre enfermedades autoinmunes publicados hasta la fecha, el haplotipo HERV-K 18.3 (97Y/154W, SNP1\*A-SNP2\*G) mostró asociación con la susceptibilidad frente al desarrollo de enfermedades autoinmunes ( $p=0.0008$ , OR(95% CI)=1.22(1.09-1.38). En conclusión, confirmamos la asociación entre HERV-K18 y el riesgo a padecer enfermedades autoinmunes, delimitando esta asociación al haplotipo HERV-K18.3.

### 3. Estudio del papel del HERV-Fc1 en la susceptibilidad al desarrollo de la EM

El estudio caso-control mostró diferencias significativas en dos de las tres cohortes españolas en las que se estudió el polimorfismo relacionado con el HERV-Fc1. Al realizar el meta-análisis con los datos previamente publicados en poblaciones del Norte de Europa,

corroboramos la asociación descrita previamente en la literatura, observando una relación significativa entre portadores del alelo C y la susceptibilidad a desarrollar EM [rs391745 portadores alelo C:  $p_{M-H}=0.0005$ ;  $OR_{M-H}(95\%CI)=1.27(1.11-1.45)$ ]. Además, de forma concordante con los descubrimientos previos, cuando el análisis queda restringido a las formas remitente recurrente y secundaria progresiva, se observa un ligero incremento en la fuerza de asociación [ $p_{M-H}=0.0003$ ;  $OR_{M-H}(95\%CI)=1.32(1.14-1.53)$ ]. Por lo que, en resumen, corroboramos la asociación de HERV-Fc1 con la susceptibilidad a desarrollar EM en una población de otra latitud, lo cual tiene interés considerando el efecto de ésta en la susceptibilidad a la enfermedad.

#### 4. Estudio del posible efecto de los alelos HLA de clase I y II en relación con la susceptibilidad al desarrollo de reacciones anafilácticas frente al Natalizumab.

El estudio HLA de un total de 119 pacientes tratados con Natalizumab, muestra la existencia de diferencias significativas entre los tipajes observados. Por un lado se encontró un aumento significativo de los alelos *HLA-DRB1\*13* y *HLA-DRB1\*14* entre los pacientes que desarrollaron reacciones anafilácticas tras el tratamiento con Natalizumab [ $p_{M-H}=3\times 10^{-7}$ ;  $OR_{M-H}(95\%CI)=8.96(3.40-23.64)$ ], con un valor predictivo positivo (VPP) del 82%. Por el contrario, el ser portador del alelo *HLA-DRB1\*15* podría proteger frente al desarrollo de alergia al Natalizumab, ya que dicho alelo se encontraba en una proporción significativamente mayor en el grupo de individuos que no mostraron síntomas de alergia [ $p_{M-H}=6\times 10^{-4}$ ;  $OR_{M-H}(95\%CI)=0.2(0.08-0.50)$ ], con un VPP del 81%. Estos datos podrían ser de gran utilidad a la hora de identificar, previo al uso del tratamiento, a los pacientes con un mayor riesgo a sufrir reacciones adversas.

#### 5. Participar en el estudio del inhibidor del transportador nuclear CRM1, KPT350, como posible tratamiento protector frente al daño axonal observado en las enfermedades desmielinizantes

El estudio muestra una eficacia pre-clínica demostrada en tres modelos animales distintos (EAE inducido por MOG, modelo de EAE focalizado, y el modelo de excitotoxicidad inducida por KA), apoyando la hipótesis de que el desplazamiento de cargos nucleares es importante en la neurodegeneración. Se observó por estudios “in silico” que ambos fármacos, KPT256 y KPT350, de administración oral, se unían de manera reversible a la hendidura reactiva de CRM1. La neuroprotección se asocia con una doble vía, implicando tanto a las células inmunes como a las células neuronales. En cuanto al papel inmunomodulador, se ha visto que los inhibidores de CRM1 reducen la carga inflamatoria del SNC al favorecer la retención nuclear de inhibidores del ciclo celular como p27. Por otro lado se observa un papel neuroprotector directo, debido a que mejora el transporte y la función mitocondrial previniendo la disrupción de la integridad del citoesqueleto, posiblemente por la retención nuclear de moléculas “axono-tóxicas” como TAU y de moléculas “protectoras” involucradas en la defensa anti-oxidante, como NFR2.

## CONCLUSIONES

1. De los 3 SNPs (rs6622139, rs6622140 y rs1290413) y 2 mutaciones existentes en la copia de HERV-W situada en el CrX, solo uno de ellos, rs6622139, se encuentra asociado con la susceptibilidad a desarrollar EM en mujeres y con la severidad de la misma, apuntando a esta inserción como posible origen cromosómico de Env del tipo MSRV.
2. Ninguno de los 2 SNPs presentes en la copia de HERV-W situada en el Cr20 (NCBI\_ss# SNP1: 974293065 y SNP2:974293066) se encuentra asociado con la susceptibilidad a desarrollar EM, por lo que dicha copia queda descartada como origen genómico de Env del tipo MSRV.
3. HERV-K18 se encuentra asociado con el riesgo a padecer enfermedades autoinmunes, delimitando esta asociación al haplotipo HERV-K18.3.
4. El polimorfismo rs391745, situado cerca de la inserción de HERV-Fc1 y estudiado previamente en poblaciones del Norte de Europa, se encuentra asociado con la susceptibilidad a desarrollar EM. Dicha asociación se delimita a las formas no PP de la enfermedad.
5. El genotipado de la región *HLA-DRB1* podría utilizarse como método informativo previo al tratamiento con Natalizumab, con el fin de identificar a los pacientes con un mayor riesgo de desarrollar reacciones de hipersensibilidad frente al tratamiento. Los alelos *HLA-DRB1\*13* y *HLA-DRB1\*14* se encuentran incrementados entre los pacientes que desarrollaron reacciones anafilácticas/anafilactoides, mientras que el ser portador del alelo *HLA-DRB1\*15* parece estar asociado con un efecto protector.
6. Las estrategias dirigidas a inhibir la exportación nuclear podrían ser efectivas reduciendo el daño axonal presente en las enfermedades neurodegenerativas como la EM, ya que la administración oral de inhibidores reversibles KPT en modelos murinos preclínicos de desmielinización atenúa significativamente la progresión de la enfermedad, disminuyendo la proliferación de células inmunes y preservando la integridad del citoesqueleto incluso en axones desmielinizados



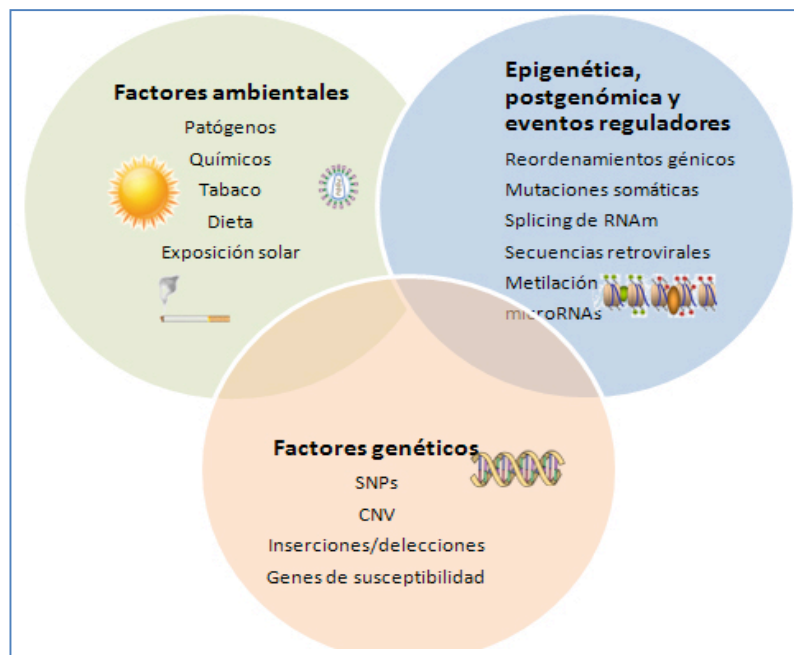


# INTRODUCCIÓN

## 1. Esclerosis Múltiple

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica progresiva caracterizada por inflamación en el sistema nervioso central (SNC), acompañada por desmielinización (seguida por remielinización limitada en algunos casos), daño axonal, y disfunción neurológica progresiva<sup>[1-3]</sup>. A pesar de que su etiología es aún desconocida, se engloba dentro de las enfermedades complejas al no depender de la acción de un único gen o factor ambiental, y no seguir un modelo Mendeliano de herencia.

La susceptibilidad a desarrollar EM viene determinada tanto por factores genéticos y epigenéticos, como por sus posibles interacciones con el medio ambiente<sup>[4]</sup> (Fig.1). La heredabilidad de un sustrato genético más o menos susceptible al desarrollo de la enfermedad únicamente resultaría en el desarrollo de la misma en el caso de interactuar con una serie de factores ambientales<sup>[3, 5, 6]</sup>.



**Figura 1. EM como una enfermedad compleja**, resultado de la interacción de factores genéticos, epigenéticos y ambientales. Figura modificada de Oksenberg and S.E.Baranzini, 2010

## 1.1 Datos epidemiológicos de la EM

La edad de debut de la EM se encuentra habitualmente entre los 20 y los 40 años<sup>[7]</sup>, siendo raro el inicio de la enfermedad en personas mayores de 65 años, y afectando en mayor medida a las mujeres que a los hombres (ratio 2:1)<sup>[7]</sup>. En muchos países, se trata de la causa principal de discapacidad neurológica no traumática en adultos jóvenes<sup>[8]</sup>. La federación internacional de EM, en su proyecto *Atlas of MS 2013*<sup>[9]</sup>, estima que aproximadamente 2.3 millones de personas en el mundo podrían sufrir actualmente dicha enfermedad. Sin embargo, su prevalencia no guarda una distribución uniforme a lo largo del área geográfica, siendo más frecuente en el Norte de América y Europa, y menos común en el África Sub-Sahariana y el Este de Asia. Además, se observa una variación de la prevalencia en función de la latitud, encontrándose los ratios más altos en latitudes de entre los 45 y los 66 grados al Norte, mientras que la prevalencia va disminuyendo en las zonas más cercanas al ecuador<sup>[10]</sup>. Los estudios de migración han resaltado la importancia que puede tener el lugar de residencia durante la infancia, de tal manera que si un individuo menor de 15 años migrara de un país a otro, pasaría a adoptar el riesgo atribuido a la localización geográfica de destino<sup>[11, 12]</sup>. Estos estudios, además de apoyar la existencia de factores ambientales en la patología de la EM, apuntan a que el riesgo a desarrollar la enfermedad podría dictaminarse a edades tempranas, cobrando una mayor importancia los factores ambientales a los que se vería expuesto el individuo genéticamente predispuesto durante su infancia y juventud. Existen estudios que incluso defienden la importancia de esta exposición durante el período de gestación, describiendo una mayor proporción de pacientes nacidos en primavera frente a otoño, y relacionado esta diferencia con los distintos niveles de vitamina D que posee la madre durante el embarazo<sup>[13-16]</sup>.

## 1.2 Factores ambientales

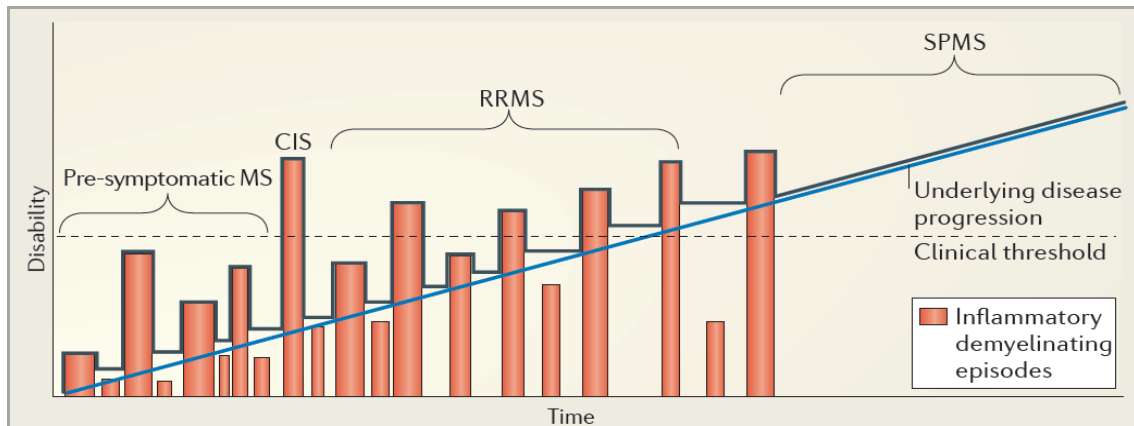
Entre los factores ambientales propuestos por su posible contribución a una mayor susceptibilidad al desarrollo de EM, se encuentran distintas infecciones virales (destacando el importante papel de componentes del grupo Herpesvirus como el virus Epstein Barr (VEB)<sup>[17-20]</sup>), una baja exposición solar o una deficiencia en vitamina D<sup>[20-27]</sup>, distintos hábitos alimenticios<sup>[28]</sup> entre los que podría estar un mayor consumo de sal<sup>[29]</sup>, el padecimiento de obesidad durante la infancia o adolescencia<sup>[30, 31]</sup>, el padecimiento de anemia<sup>[32]</sup>, la microbiota<sup>[33, 34]</sup>, y el tabaco<sup>[20, 35-41]</sup>. Sin embargo, se necesitan más estudios capaces de esclarecer aún más el papel de estos factores, ya que del total de los 44 factores de riesgo que se han llegado a relacionar con el desarrollo de la enfermedad, un estudio reciente<sup>[42]</sup> señala que únicamente el VEB, la mononucleosis infecciosa y el tabaco, estarían respaldados por evidencias adecuadas con credibilidad epidemiológica en base a los estudios y meta-análisis realizados hasta la fecha, teniendo en cuenta los tamaños muestrales utilizados, o la posible existencia de sesgos o de heterogeneidad entre las poblaciones estudiadas<sup>[42]</sup>.

### 1.3 Formas clínicas de la EM

La EM es una enfermedad muy heterogénea, que muestra una sintomatología y unos signos clínicos muy variables dependiendo de las partes del cerebro y/o de la médula espinal afectadas. Hasta el momento resulta imposible predecir la evolución clínica de la enfermedad, referida tanto al grado de disfunción motora como a la disfunción cortical, ya que tampoco se observa una correlación entre ambas. Sin embargo, según el curso clínico de la enfermedad, el número de brotes y el grado de recuperación después de cada uno de ellos, la EM se puede clasificar en distintas formas clínicas (Fig.2):

- Síndrome clínicamente aislado (CIS): muchos de los pacientes muestran evidencias de una única lesión, aunque más de un tercio de los pacientes, aproximadamente un 34%, desarrollarán alguna evidencia clínica de EM dentro de los siguientes 5 años<sup>[7, 43]</sup>.
- Remitente recurrente (RR): es la forma clínica mayoritaria, afecta aproximadamente al 85% de los pacientes<sup>[44, 45]</sup>. Los pacientes experimentan de media dos recaídas por año<sup>[7, 46]</sup>, presentando una recuperación gradual parcial o completa tras el brote en los siguientes meses, con prominentes manifestaciones inflamatorias y clínicas estables entre recaídas. De forma general, se encuentran entre dos y tres veces más afectadas por este tipo las mujeres que los hombres<sup>[46]</sup>.
- Secundaria progresiva (SP): Tras el curso inicial RR, la mayoría pasa a una etapa menos inflamatoria, caracterizada por un deterioro lento pero progresivo de la función neurológica sin brotes concomitantes, y atrofia en el SNC. La forma progresiva se suele manifestar en cualquier momento entre los 5 y 35 años del inicio de la enfermedad<sup>[7]</sup>, de tal manera que a los 10 años del inicio de la enfermedad, un 50% de los RR pasa a desarrollar una forma SP<sup>[46]</sup>, y el porcentaje aumenta a un 90% tras 20-25 años<sup>[47]</sup>.
- Primaria progresiva (PP): afecta solo al 10-15% de los pacientes, la enfermedad sigue un curso progresivo con poca inflamación, sin observarse recuperaciones o recaídas. Estos pacientes suelen ser de mayor edad que los que inician con un curso RR<sup>[46]</sup>.
- Primaria recurrente (PR): es la forma menos frecuente de la enfermedad, los pacientes empiezan con un patrón PP, pero sufren exacerbaciones neurológicas fluctuantes acumulando discapacidad de forma más rápida que las formas PP<sup>[48]</sup>.

La EM también se ha relacionado con casos de desmielinización fulminantes, que afectarían a menos del 4% de los pacientes. Dichos casos se han descrito como variantes raras de la EM, caracterizadas por un curso severo y una evolución muy rápida de la enfermedad, que muestran cambios neuropatológicos inusuales. Entre ellas se encuentran las esclerosis de Marburg (encefalomielitis periaxial esclerótica) y de Baló (encefalomielitis periaxial concéntrica)<sup>[49]</sup>.



**Figura 2. Formas clínicas y evolución de la EM.** Representa el curso clínico más habitual de los pacientes con EM, empezando con un brote aislado o una forma CIS, y avanzando progresivamente en forma de brotes y períodos de remisión, hasta llegar a una forma SP, donde ya no se observan brotes sino una progresión continua de la discapacidad. La evolución de la enfermedad, así como los tiempos y el progreso de la discapacidad, varían según cada paciente. P.K.Stys et al; 2012

#### 1.4 Patogenia de la EM

La EM es una enfermedad inflamatoria crónica y degenerativa del SNC, caracterizada por la presencia de placas multifocales de desmielinización primaria con pérdida de oligodendrocitos y esclerosis astroglial. Posee una patogénesis muy compleja, que involucra tanto componentes de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa. Los mecanismos inmunopatogénicos subyacentes a la enfermedad continúan sin estar completamente dilucidados actualmente, debido en parte a la gran heterogeneidad existente en distintos aspectos de la EM, incluyendo los mecanismos patogénicos, la presentación clínica, la actividad de la enfermedad observada por resonancia magnética, y la respuesta a tratamientos.

La EM se caracteriza por una permeabilidad aumentada de la barrera hematoencefálica (BHE), permitiendo el paso de células T, células B y macrófagos al SNC. Las lesiones inflamatorias desmielinizantes se caracterizan por infiltrados perivasculares que contienen células T CD8+ (Tc), células T CD4+ (Th), células T  $\gamma\delta$ , monocitos, y algunas células B y células plasmáticas<sup>[50]</sup>. Estas lesiones activas contienen un número significativo de macrófagos que poseen restos de mielina en su interior, así como un depósito significativo de factores del complemento e inmunoglobulinas<sup>[50]</sup>. La hipótesis tradicional apuntaba a las células T CD4+ como principales células efectoras en la fisiopatología de la enfermedad. Dichas células, una vez en el SNC, reaccionan con componentes de la mielina activando una cascada pro-inflamatoria. Este proceso inflamatorio reversible que causa la destrucción de las vainas de mielina, puede progresar hacia un daño axonal irreversible, causando una disrupción de la neurotransmisión normal, responsable de la sintomatología motora y de la discapacidad clínica observada. Sin embargo, la idea de que la EM es una enfermedad mediada de forma principal por las células T CD4+ ha sido replanteada, y se ha enfatizado el papel de las células T CD8+,

otros tipos de células T, las células B y la inmunidad innata en la patogénesis de la enfermedad<sup>[51]</sup>. El hecho de que estén presentes células B, células plasmáticas e inmunoglobulinas en las lesiones<sup>[50]</sup> y LCR de pacientes con EM<sup>[51]</sup>, muestra que las células B también contribuyen a la enfermedad. Dichas células pueden contribuir a través de distintos mecanismos: pueden presentar antígenos a las células T CD4+ para favorecer esa respuesta pro-inflamatoria, producir anticuerpos y autoanticuerpos frente a la vaina de mielina y a los oligodendrocitos (OLG) en el caso de células B autorreactivas, participar en la regulación del sistema inmune a través de la liberación de citoquinas, y formar nuevas estructuras linfoides en las meninges. En las meninges cerebrales de pacientes con EM progresiva se ha observado que las células B pueden formar estructuras linfoides ectópicas. Debido al hecho de ser generadas en los sitios de inflamación crónica, se piensa que pueden jugar un papel importante a la hora de mantener el proceso inflamatorio<sup>[52]</sup>. Estas estructuras contienen células B, células plasmáticas, células T, y células dendríticas foliculares en 2 de cada 3 pacientes con EM SP, pero no en las formas RR o PP; y pueden provocar la activación de células T en el SNC, la activación de la microglia, leucoinflamación, y pérdida neuronal en el neocórtex<sup>[52]</sup>.

Aunque inicialmente se clasificaba como una enfermedad de la sustancia blanca, lo cierto es que en el 38% de las biopsias cerebrales realizadas a pacientes con lesiones en la materia blanca se aprecia desmielinización cortical<sup>[7]</sup>. Este hecho apunta a que no se trata de una enfermedad exclusiva de la sustancia blanca, sino que las lesiones corticales son frecuentes y están fuertemente asociadas con inflamación meníngea<sup>[7]</sup>.

### *Daño axonal*

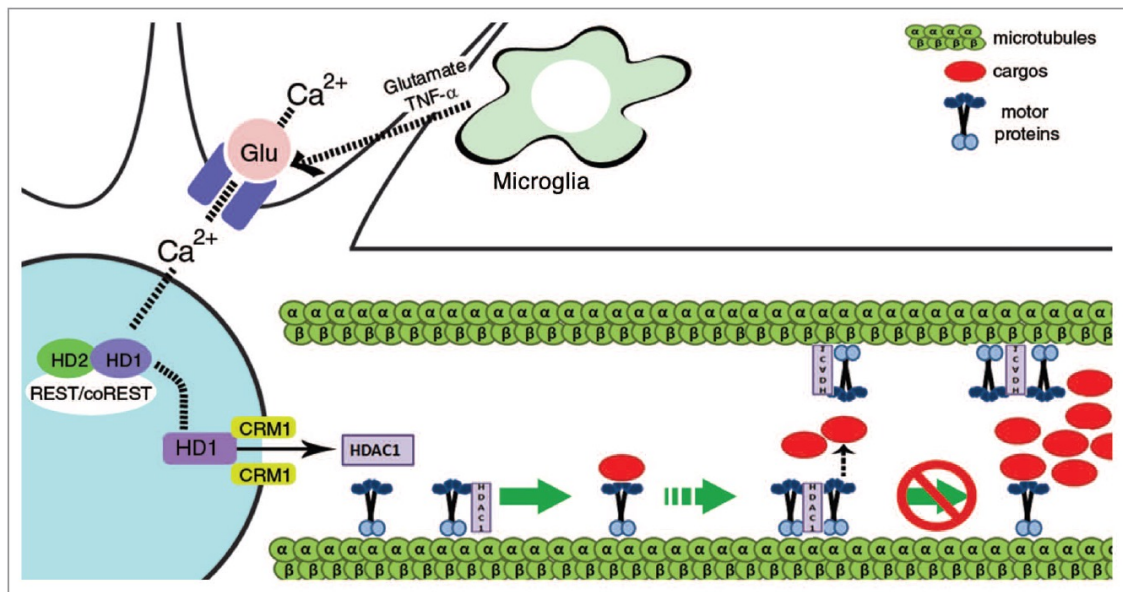
El daño axonal es una marca patológica de enfermedades neurodegenerativas como la EM. Los estudios muestran que la degeneración axonal ocurre durante todo el curso de la enfermedad y juega un papel crítico en la irreversibilidad de la discapacidad en la EM<sup>[53]</sup>. Se asocia, entre otras causas, con una disrupción del citoesqueleto y un tráfico aberrante de proteínas, aunque los mecanismos moleculares del daño axonal en la EM no han sido bien caracterizados<sup>[54]</sup>. El transporte axonal basado en microtúbulos es necesario para la función normal y la supervivencia de las neuronas, ya que la mayoría de las proteínas neuronales se sintetizan en el cuerpo celular, por lo que la comunicación entre el cuerpo celular, las dendritas y el axón es fundamental<sup>[53, 54]</sup>. Las axonopatías se caracterizan por la acumulación de orgánulos y proteínas en el cuerpo celular y en el axón de las neuronas, y se piensa que la desregulación de la proteína transportadora núcleo-citoplasma (Exportina-1 o CRM1) es uno de los mecanismos que podría contribuir a la patogénesis del daño axonal localizado<sup>[54]</sup>.

CRM1 es la proteína transportadora principal núcleo-citoplasma de macromoléculas grandes, incluyendo ARN y proteínas, en mamíferos<sup>[55]</sup>. Reconoce todos aquellos cargos que posean secuencias nucleares de exportación (NES), ricas en leucina, y los transporta al citoplasma. Una vez aquí entra en juego el transporte axonal, que podría ser la causa subyacente a la

acumulación patológica de proteínas en enfermedades neurodegenerativas. Un transporte axonal incorrecto podría ser consecuencia de daño existente en las proteínas motoras o en los microtúbulos, o de una interacción dañada entre las proteínas motoras con los microtúbulos o los cargo<sup>[54]</sup>. Además, una función mitocondrial alterada también podría provocar un fallo en el transporte axonal debido a una falta de suministro de ATP, al mismo tiempo que las disrupciones en el transporte axonal pueden interferir con el transporte mitocondrial<sup>[54]</sup>.

En cerebros de EM, y en respuesta a glutamato y a citoquinas, los receptores activados por glutamato hacen que entre  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas e inducen la exportación de la enzima desacetilasa de histonas 1 (HDAC-1) al citosol de una manera dependiente de CRM1<sup>[54, 56]</sup> (Fig.2).

HDAC-1 es una enzima nuclear que interviene en la represión transcripcional, y solo en situaciones patológicas saldría al citoplasma. Una vez allí, HDAC-1 compete por unirse a las proteínas motoras, y hace que el cargo sea incapaz de formar interacciones funcionales con las proteínas motoras, bloqueando el transporte axonal y el movimiento mitocondrial<sup>[54]</sup>.



**Figura 2.** Posible efecto tóxico de la HDAC-1 en el transporte axonal. En situaciones patológicas, y en respuesta a glutamato y citoquinas, se produce un incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  en las neuronas que lleva a la exportación de HDAC-1. Una vez en el citoplasma, la proteína se une a proteínas motoras (KIF2A y KIF5) y  $\alpha$ -tubulina, interfiriendo en su capacidad para formar complejos con cargos. Kim and Casaccia 2010.

Se ha detectado HDAC-1 citosólica en cerebros de pacientes con EM, en modelos animales de desmielinización inducida por cuprizona y caracterizados por infiltración microglial y producción de citoquinas, y en neuronas cultivadas expuestas a glutamato y a  $\text{TNF}\alpha$ <sup>[54, 56]</sup>.

La mitocondria posee un papel importante en la degeneración axonal existente en todos los estadios de la EM<sup>[57]</sup>, jugando un papel crucial en el metabolismo energético y en la homeostasis celular<sup>[53]</sup>. La pérdida de mielina es uno de los principales cambios observados

durante las fases progresivas de la enfermedad. Normalmente, la conducción del impulso nervioso se da de manera saltatoria, y los canales de sodio dependientes de voltaje se acumulan en los nódulos de Ranvier, sin embargo, un axón desmielinizado pierde esta capacidad de propagación del impulso nervioso, siendo necesaria una sobre-regulación y una reorganización de los canales a través del axón. Esta nueva situación requiere mucha más demanda de energía, y si no es suficiente el aporte de ATP proveniente de las mitocondrias, las bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  necesarias para mantener el gradiente iónico comienzan a fallar, provocando un exceso de  $\text{Na}^+$  intracelular<sup>[53]</sup>. Normalmente las mitocondrias están acumuladas en los nódulos de Ranvier, y en algunos casos también en los terminales presinápticos, porque son los sitios con mayor demanda de energía. Sin embargo, en el caso de un axón desmielinizado, con la finalidad de proteger el axón y hacer frente al aumento de la demanda de energía, se observa un incremento en el número, tamaño, actividad y velocidad del movimiento de las mitocondrias, evento que se conoce como “respuesta axonal mitocondrial frente a la desmielinización”<sup>[57]</sup>. Si esta respuesta falla debido, por ejemplo, a un fallo en el transporte mitocondrial, resultaría en daño axonal.

Los cambios morfológicos asociados con daño axonal incluyen la presencia de abultamientos axonales localizados, caracterizados por la sucesión de ensanchamientos y constricciones a lo largo del axón (morfología parecida a un “collar de perlas”, por lo que se suele aplicar este término para su descripción). Se han llevado a cabo estudios con leptomicina B (LMB), un compuesto que bloquea la exportación nuclear mediada por CRM1, confirmando que la exportación de HDAC-1 se realiza a través de dicha proteína; ya que en presencia de LMB, HDAC-1 permanece en el núcleo y no se observan cambios morfológicos ni alteraciones de la mitocondria<sup>[54, 56]</sup>. Por tanto, en condiciones patológicas y en respuesta a glutamato y a citoquinas como  $\text{TNF}\alpha$ , tendría lugar una exportación de HDAC-1 al citoplasma, interfiriendo en el transporte mitocondrial e induciendo el estado “perlado” de las neuritas característico de daño axonal<sup>[56]</sup>. Esto apunta a la existencia de una desregulación de la proteína transportadora núcleo-citoplasma CRM1 conducente a daño axonal, pudiéndose plantear su inhibición como posible terapia neuroprotectora.

### 1.5 Tratamiento de la EM

El tratamiento de la enfermedad se lleva a cabo principalmente a través de la utilización de fármacos inmunomoduladores. No existió un tratamiento específico frente a la EM hasta mediados de los años noventa, época en la que se empezaron a utilizar el Interferón Beta ( $\text{IFN}_\beta$ ) y el Acetato de Glatirámico (AG)<sup>[58]</sup>. Estos dos tratamientos consiguen reducir en más de un 30% la tasa anual de recaídas de los pacientes RR, y tienen un perfil de seguridad muy bueno a largo plazo, tanto es así que el AG puede ser utilizado incluso en mujeres embarazadas<sup>[7]</sup>. En una segunda etapa se incorporaron dos tratamientos más, el Natalizumab<sup>[59, 60]</sup> (anticuerpo monoclonal anti-integrina 4 en leucocitos), y el Fingolimod

(modulador del receptor de esfingosina S1P)<sup>[7]</sup>. Más recientemente han sido aprobados otros tres medicamentos que aún no han sido comercializados en España: la Teriflunomida (tratamiento inmunomodulador), el Dimetilfumarato (inhibidor de la síntesis de pirimidina), y el Alemtuzumab (anticuerpo monoclonal anti-leucocitos)<sup>[61]</sup>.

Actualmente existen 13 medicamentos modificadores de la enfermedad aprobados por la Administración de Medicamentos y de Alimentos de Estados Unidos (FDA) y por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA). Entre los tratamientos de primera elección hoy en día, se encuentran tanto el IFN $\beta$  en todas sus formas comerciales (Betaferón®, Avonex® y Refib®), como el AG (Copaxone®). En el caso de que estos tratamientos no controlen eficazmente la actividad inflamatoria o muestren efectos adversos, o en el caso de pacientes con un inicio más agresivo de la enfermedad, se pasa a los tratamientos de segunda línea, donde se encuentran, por ejemplo, el Natalizumab (Tysabri®), el Fingolimod (Gilenya®) o el Alemtuzumab (Lemtrada®). Estos tratamientos generalmente muestran una mayor eficacia frente a recaídas que los utilizados como tratamiento de primera línea, pero se mantienen en un segundo plano debido a su perfil de seguridad, ya que los posibles efectos adversos a largo plazo permanecen aún desconocidos. Así mismo, la incorporación de tratamientos administrados por vía oral, como son el Fingolimod, la Teriflunomida y el Dimetilfumarato, ha supuesto otro gran avance en este campo, ya que consigue mejorar la afectividad, tolerancia y adherencia de los pacientes al tratamiento.

Actualmente, existen varios medicamentos adicionales que se encuentran en distintas fases de ensayos clínicos, como son el Laquinimod (quinolona-3-carboxamida que actúa como inmunomodulador), y los biológicos Daclizumab (anticuerpo anti-Tac IgG1 humanizado recombinante), Ocrelizumab (anticuerpo monoclonal humanizado frente a los linfocitos B CD20-positivos), y Ofanatumumab (anticuerpo monoclonal humano IgG1k que se une específicamente a la molécula CD20 de las células B)<sup>[7]</sup>. Sin embargo, todavía quedan muchos avances por realizar, ya que las terapias actuales anti-inflamatorias e inmunosupresoras son beneficiosas en pacientes con EM RR, pero no son tan efectivas en el caso de las formas progresivas de la enfermedad, donde el tratamiento podría necesitar la combinación de estrategias anti-inflamatorias, regenerativas y neuroprotectoras<sup>[62]</sup>.

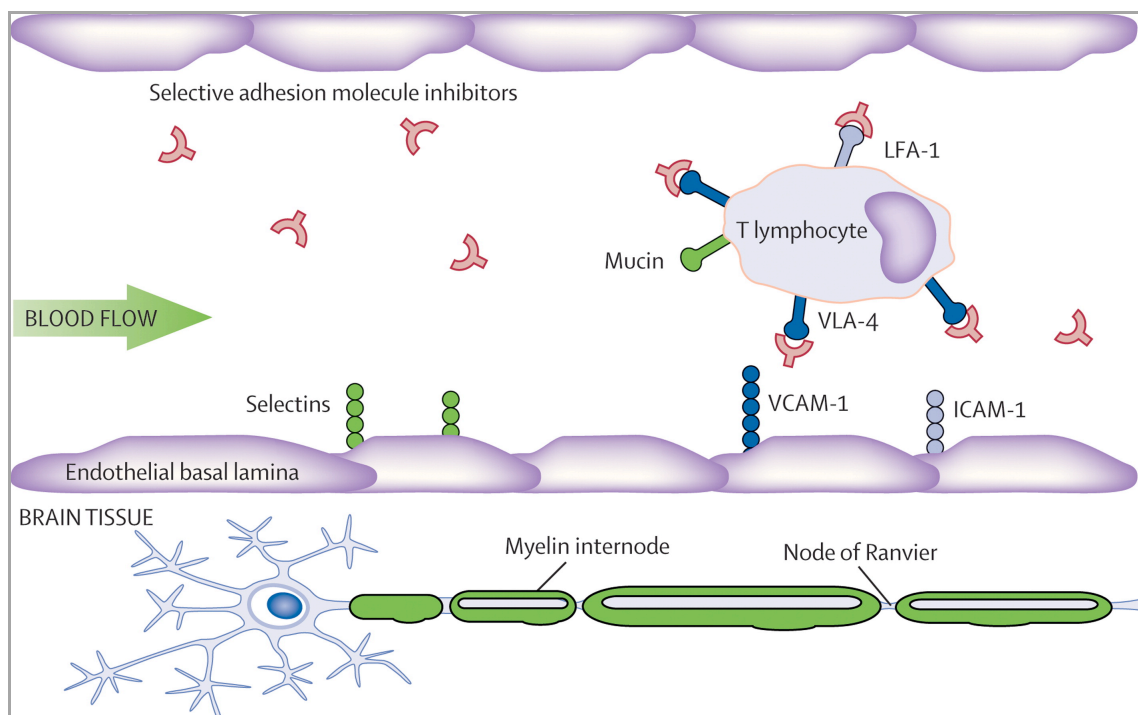
A la hora de diseñar y desarrollar nuevos tratamientos, y una vez determinadas las dianas terapéuticas, se deben estudiar sus mecanismos de acción y sus posibles efectos, y para ello se utilizan tanto modelos ex vivo como modelos in vivo.



### Natalizumab

La migración de linfocitos a través de la BHE es un mecanismo importante en la formación de lesiones inflamatorias en el cerebro y médula espinal, que pueden resultar en placas de desmielinización y daño axonal<sup>[63]</sup>. Para que pueda darse dicha extravasación de linfocitos al SNC, es necesario que una proteína de membrana de los linfocitos, la integrina  $\alpha_4\beta_1$  (también conocida como VLA-4), interaccione con la molécula de adhesión celular de los vasos sanguíneos (VCAM-1), que se sobreexpresa en el endotelio durante la inflamación<sup>[63]</sup>. Si buscamos información relativa al Natalizumab en la Agencia Española del Medicamento<sup>[64]</sup>, observamos que se trata de un anticuerpo humanizado recombinante anti- $\alpha_4$ -integrina producido en una línea celular murina mediante tecnología de ADN recombinante. El tratamiento con dicho anticuerpo, por tanto, interrumpe la migración de linfocitos hacia el SNC, reduciendo la inflamación (Fig.3).

El Natalizumab fue aprobado en 2004 por la FDA. Debido a sus resultados prometedores en vista a la supresión clínica y de la actividad observada por resonancia magnética, supuso una gran promesa en la terapia de la EM, haciendo referencia a una “ausencia de la actividad de la enfermedad”. Sin embargo, tres meses después fue retirado del mercado debido a que aparecieron 3 casos de leucoencefalitis multifocal progresiva (PML), 2 en pacientes de EM en fase de ensayo III<sup>[65, 66]</sup>, y otra en un paciente con enfermedad inflamatoria intestinal<sup>[67]</sup>.



**Figura 3. Mecanismo de acción del Natalizumab.** El Natalizumab es un anticuerpo humanizado recombinante anti- $\alpha_4$ -integrina, que impide la extravasación de linfocitos a través de la lámina basal endotelial. Su unión a VLA-4 impide

que ésta interaccione con la molécula VCAM-1 expresada en las células endoteliales durante situaciones de inflamación. Carson et al, 2009

La PML es una infección oportunista del SNC, causada por el virus John Cunningham (JCV), que resulta fatal en aproximadamente el 20% de los casos asociados al uso de Natalizumab, y provoca una morbilidad significativa y una discapacidad irreversible en los pacientes que sobreviven<sup>[68]</sup>. En el año 2006 volvió a ser comercializado en Estados Unidos, y fue aprobado también por la Agencia Española de Medicamentos (AEMPS).

Los dos ensayos clínicos largos de fase III que supusieron la aceptación del Natalizumab, AFFIRM<sup>[63]</sup> y SENTINEL<sup>[69]</sup>, junto con los dos estudios de fase IV que han evaluado la seguridad a largo plazo y la eficacia del tratamiento, STRATA<sup>[70]</sup> y TOP<sup>[71]</sup>, sugieren que un tratamiento temprano puede aportar una gran ventaja con respecto a la subsecuente supresión de la actividad clínica<sup>[68]</sup>. Se trata de una terapia altamente efectiva y bien tolerada por los pacientes con EM activa, que puede tener también efectos beneficiosos en la fatiga, cognición, y calidad de vida de los mismos<sup>[68]</sup>; sin embargo, su uso está limitado debido a sus efectos adversos. Hoy en día, su uso está indicado en pacientes mayores de 18 años que muestren una actividad elevada de la enfermedad a pesar de haber sido tratados con IFN $\beta$  o AG, o para aquellos que cursen con RR grave de evolución rápida<sup>[64]</sup>. Entre los efectos adversos más serios se encuentran el riesgo a sufrir una PML, lo que ocurre con una incidencia de 3.78 casos por cada 1000 pacientes, las infecciones (3.2%), y las reacciones de hipersensibilidad<sup>[68]</sup>. Estas últimas incluyen reacciones de hipersensibilidad serias (0.5%), y anafilaxis o shock anafiláctico (0.2%), ambas observadas con menor frecuencia en los estudios abiertos de larga duración en comparación con los ensayos en fase III (1.3% y 0.8% respectivamente)<sup>[68]</sup>. Estas reacciones suelen darse normalmente durante la perfusión o en el transcurso de la siguiente hora, aunque debe considerarse el riesgo de que aparezcan en cada una de las perfusiones. Asimismo, el tratamiento debe ser suspendido automáticamente en aquellos pacientes que muestren algún tipo de síntoma de hipersensibilidad<sup>[64]</sup>.

## 1.6 Modelos animales de EM

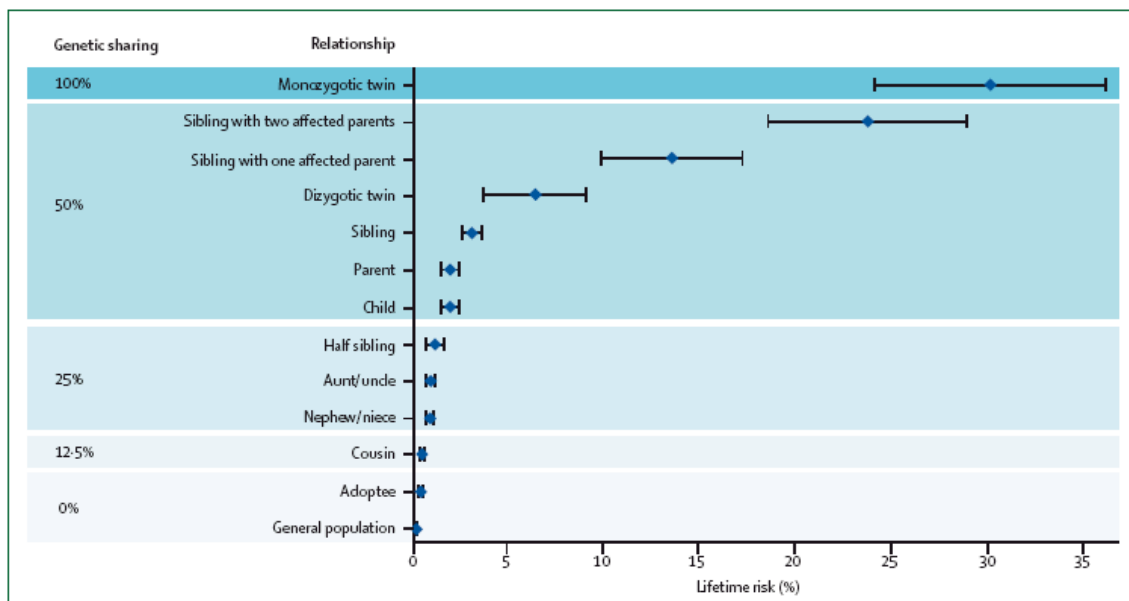
Existen tres modelos animales principales: inducción de la enfermedad por agentes tóxicos como la cuprizona<sup>[72]</sup>, modelos virales (virus murino de encefalomiелitis Theiler)<sup>[73]</sup>, y diferentes tipos de encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE)<sup>[74]</sup>. Sin embargo, a causa de la etiología compleja de la enfermedad, ninguno ha conseguido mimetizar al completo la patología de la EM, sino que cada modelo refleja un aspecto concreto de la enfermedad.

El más utilizado es el EAE, en el que se induce autoinmunidad frente a los componentes del SNC a través de la inmunización de los ratones con antígenos derivados de la proteína básica de mielina<sup>[75]</sup>. Esta inmunización frente a la proteína básica de mielina se induce habitualmente

mediante la inyección subcutánea de una emulsión de MOG en adyuvante completo de Freund (CFA), que incluye una cierta cantidad de un lisado de *Mycobacterium tuberculosis* con el objetivo de iniciar o potenciar una respuesta por parte del sistema inmune; así como una inyección intraperitoneal de una solución de la toxina *Bordetella pertussis* que presumiblemente permeabilizaría la BHE. Dicho modelo muestra muchas de las marcas patológicas de la enfermedad, como es una activación del sistema inmune con infiltración en el SNC, desmielinización y daño axonal. En cuanto a la clínica, los ratones con EAE presentan afectado el neuroeje y muestran parálisis de los miembros, parcial o total dependiendo de la severidad de la enfermedad, que asciende generalmente en sentido caudo-rostral<sup>[74, 76]</sup>. Las lesiones inflamatorias tienen lugar en localizaciones aleatorias del SNC, por lo que existe una alta variabilidad en el curso de la enfermedad. El método de medida de la discapacidad se basa en una escala de 5 puntos: una puntuación igual a 0 es indicativa de que el ratón se encuentra sin ninguna sintomatología, se puntúa como 1 cuando solo se ve afectada la cola, como 2 si se observa descoordinación y falta de agarre en las patas traseras, como 3 en el caso de presentar parálisis de las patas traseras, 4 si se observa tetraplejia, y una puntuación de 5 indica la muerte del ratón<sup>[74]</sup>. Estos patrones de manifestación clínica de la enfermedad son debidos al ataque preferencial de la médula espinal. Son muchos los tratamientos conocidos hoy en día que han utilizado este modelo animal bien para su desarrollo, bien para estudiar y conocer los mecanismos de acción subyacentes, empezando por la Mitoxantrona<sup>[77, 78]</sup>, el AG<sup>[79-83]</sup>, el Natalizumab<sup>[84-87]</sup>, o el Fingolimod<sup>[74, 88, 89]</sup>.

## 2. Estudio de la Genética de la EM

La existencia de factores de riesgo genético relacionados con la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad se pone de manifiesto en los estudios epidemiológicos. La prevalencia de la EM, por ejemplo, varía según los distintos grupos étnicos. Es más frecuente en personas de ascendencia norte Europea<sup>[10]</sup>, rara en Mongoles, Japoneses, Chinos, Indios Americanos y Esquimales; y muy rara en Africanos negros, Aborígenes, Lapones y Gitanos<sup>[90]</sup>. Los estudios de agregación familiar indican que entre el 10 y el 15% de los casos se dan entre familiares de primer grado de los pacientes<sup>[7]</sup>, y que el riesgo a desarrollar la enfermedad se ve incrementado en relación a la proximidad genética con el familiar afectado<sup>[2]</sup> (Fig. 4). La evidencia más clara viene dada por los estudios comparativos en gemelos, donde se observa una concordancia de aproximadamente el 30% en gemelos monocigóticos frente al 5% observado en gemelos dicigóticos, y el riesgo va disminuyendo conforme lo hace el grado de parentesco hasta llegar al caso de un familiar adoptado que mostraría el mismo riesgo que la población general<sup>[2]</sup>.



**Figura 4. Papel de la genética en la EM.** A mayor carga genética compartida entre dos familiares discordantes para la enfermedad, mayor es el riesgo de desarrollar EM, siendo un 30% el mayor riesgo existente, correspondiente a los gemelos monocigóticos que comparten el 100% de la genética. A.Compston et A. Coles, 2008

Todos estos estudios apoyan la existencia de una susceptibilidad genética heredable a padecer la enfermedad, que vendría dada por una interacción heterogénea de múltiples genes independientes. Sin embargo, ese componente exacto de riesgo hereditario es difícil de determinar, ya que la genética no es suficiente por sí misma para garantizar el desarrollo de la enfermedad, sino que debe ocurrir de forma necesaria la exposición a ciertos factores ambientales.

## 2.1 Estudios previos a los GWAS

Los estudios de ligamiento empezaron a utilizarse con el propósito de identificar genes implicados en enfermedades monogénicas<sup>[91]</sup>. Utilizan muestras de familias con múltiples individuos afectados con el fin de estudiar la cosegregación de un marcador genético con la enfermedad. En el caso de la EM, se han publicado varios estudios de ligamiento genómicos independientes<sup>[92-97]</sup>, sin embargo, estos estudios solo fueron capaces de confirmar la región perteneciente a los antígenos leucocitarios humanos (HLA) en la posición 6q21 como una región de riesgo asociada a la enfermedad. Se concluyó que estos estudios no tienen suficiente poder estadístico como para poder identificar loci de riesgo en enfermedades genéticas complejas, donde varios genes con efectos modestos pueden contribuir a la enfermedad<sup>[98]</sup>. Esto se ratificó en 2005, cuando se llevó a cabo un ambicioso estudio del genoma completo, con un número mayor de muestras y marcadores, que tampoco fue capaz de reconocer ninguna región fuera del HLA<sup>[99]</sup>.

Los estudios de asociación de genes candidatos constituyen una estrategia que también ha sido muy utilizada en el estudio del papel de la genética de la EM. Se basan en estudios de tipo caso control, dirigidos a esclarecer el posible papel de un gen candidato elegido bien por su funcionalidad, bien por su localización en regiones previamente ligadas con la EM, en el desarrollo de la enfermedad. Tienen los inconvenientes de que el gen candidato debe ser previamente fijado, y de que solo permiten identificar mutaciones ligadas a un gen concreto. A pesar de poseer mayor poder estadístico que los estudios de ligamiento, consiguieron pocos progresos a nivel global en la identificación de alelos de riesgo relevantes asociados en regiones fuera del HLA<sup>[100]</sup>, dado que, como se evidenció posteriormente, su efecto modesto en la predisposición a padecer EM exigía comparar un número mayor de pacientes y controles.

## 2.2 Estudios de asociación del genoma completo

Los estudios de asociación del genoma completo (GWAS) surgieron como estudios con mayor poder estadístico, capaces teóricamente de detectar genes susceptibles con efectos modestos en enfermedades genéticas complejas multifactoriales como la EM. En contraste con los estudios de genes candidatos, no parten de una hipótesis inicial sino que analizan el genoma completo utilizando como marcadores polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en estudios de tipo caso control que incluyen individuos que no están relacionados genéticamente<sup>[98]</sup>.

El primer GWAS de EM se desarrolló en 2007 e identificó efectos no relacionados con la región HLA<sup>[101]</sup>. Estos genes que codifican los receptores de la interleuquina 7 y 2 (IL7Rα e IL2Rα) mostraban un efecto más modesto que el HLA ( $OR < 1.35$ )<sup>[101]</sup>. Hasta el verano de 2011, el conjunto de los GWAS y de los meta-análisis realizados, habrían identificado hasta 26 SNP asociados con EM. Esto planteaba el hecho de que para poder identificar loci de riesgo con

Odds Ratio (OR) modestas del tipo 1.2 o menores, el tamaño muestral debería incluir alrededor de unos 10.000 casos y controles, por lo que sería necesaria una colaboración internacional. Por ello, a finales del año 2011, el Consorcio de Genética de la Esclerosis Múltiple (IMSGC) en asociación con el Consorcio Caso Control Wellcome Trust 2 (WTCCC2) llevó a cabo un GWAS que incluía 10000 EM y casi 20000 controles. Identificaron 52 loci de riesgo para la EM, 29 de los cuales no habían sido identificados hasta ese momento, y todos ellos con una OR modesta (1.1-1.3)<sup>[98, 102]</sup>. Además, en el año 2013, el IMSGC llevó a cabo un proyecto que incluyó 29.300 pacientes y 50.794 controles, y usó un nuevo array de SNPs específicamente diseñado para rastrear regiones de susceptibilidad para enfermedades mediadas por el sistema inmune como la EM, el ImmunoChip (Illumina INC, USA)<sup>[103]</sup>. Este estudio fue capaz de describir 48 variantes nuevas génicas implicadas, incrementando el número de variantes asociadas conocidas a un total 110<sup>[103]</sup>. Como cada una de estas variantes confiere individualmente un riesgo muy pequeño de desarrollar la enfermedad, en conjunto son capaces de explicar de un 20 a un 28% del riesgo existente en gemelos a sufrir EM (28% cuando incluimos los efectos ya conocidos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC))<sup>[103]</sup>.

Los GWAS han permitido identificar muchos loci de susceptibilidad implicados en distintas enfermedades, permitiendo descubrir nuevos mecanismos implicados en su desarrollo, como ocurre en el caso de la enfermedad de Crohn y la autofagia<sup>[104]</sup>. En el caso concreto de la EM, los datos de GWAS han sido útiles a la hora de poder comprender mejor su etiología y naturaleza inmunológica. De forma remarcable, la mayoría de los loci asociados a EM se localizan cerca o dentro de genes codificantes para moléculas relacionadas con el sistema inmune innato, subrayando el importante papel que juega el sistema inmune en el desarrollo de la enfermedad. Además, cerca de un tercio de los loci descritos se han asociado también con al menos otra enfermedad autoinmune, como es el caso de *IL2RA*, *CLEC16* y *CD226*, que muestran un papel de susceptibilidad frente al desarrollo de diabetes tipo I, apoyando el hecho de que defectos comunes en vías de regulación inmunes esenciales podrían iniciar el desarrollo de patologías autoinmunes<sup>[98]</sup>. Parece existir un conjunto de genes compartido entre múltiples enfermedades autoinmunes, sumado al efecto de genes específicos de cada enfermedad. Además, los marcadores asociados en estos estudios no son necesariamente por sí mismos las variantes causales, sino que pueden encontrarse en desequilibrio de ligamiento con ellas, por lo que se necesitan estudios sobre la relevancia funcional de las variantes genéticas para encontrar las variantes causales<sup>[98]</sup>.

### 2.3 Heredabilidad perdida EM

A pesar del gran avance que ha experimentado el estudio de la genética de las enfermedades complejas en los últimos años, los loci asociados son capaces de explicar alrededor de un cuarto de la heredabilidad asociada a la EM<sup>[100]</sup>, por lo que todavía queda una gran proporción de la heredabilidad que no ha podido ser explicada. Esta “heredabilidad perdida” incluye una

variación genética que podría contribuir a una adecuada prevención, diagnóstico y tratamiento de la EM. Uno de los problemas recae en que, a pesar de tener amplios tamaños muestrales, los GWAS cuentan con una serie de limitaciones. La primera se debe a que cuentan con un poder estadístico limitado a la hora de identificar todos los loci asociados con la enfermedad<sup>[105]</sup>. El hecho de que no sean capaces de identificar todos los loci asociados puede ser debido, entre otras causas, a la existencia de variantes raras o polimorfismos con muy baja frecuencia alélica (MAF), de 0.5% a 5%, pero con amplios efectos. También podría deberse a que las variaciones estructurales (deleciones o inserciones, e inversiones o traslocaciones) podrían ser responsables de alguna heredabilidad inexplicada; o a variaciones existentes en secuencias repetitivas del genoma, entre las cuáles se encuentran los retrovirus endógenos humanos (HERVs).

La segunda limitación recae en la dificultad de interpretar la relevancia biológica de los loci de susceptibilidad y vincularlos con la etiología de la enfermedad, debido a que gran parte de los SNPs asociados en los GWAS están situados en regiones no codificantes del genoma<sup>[105, 106]</sup>. Estudios del genoma, como el proyecto ENCODE, nos han permitido saber que gran parte de estas regiones no codificantes del genoma, lejos de formar parte del llamado “ADN basura” (como se clasificaba en un pasado reciente al pensar que carecía de funcionalidad), están involucrados en funciones de regulación. Varias evidencias sugieren el papel de una proporción de dichas variantes en mecanismos reguladores transcripcionales, incluyendo la modulación de promotores y elementos potenciadores, y un enriquecimiento en loci de expresión cuantitativos (eQTLs)<sup>[107]</sup>. Farh y sus colaboradores desarrollaron un algoritmo de mapeo fino con el que poder identificar variantes causales candidatas para 21 enfermedades autoinmunes desde los datos de genotipado, llegando a la conclusión de que aproximadamente el 90% de las variantes causales son no codificantes. Alrededor del 60% de ellas se encuentran localizadas en elementos potenciadores o inductores de la expresión génica de células inmunes<sup>[106]</sup>. La integración de los GWAS y de los datos abiertos de la cromatina, han demostrado que las variantes asociadas son particularmente activas en células T CD4+, T CD8+, y células B<sup>[108]</sup>.

Por último, la susceptibilidad de las enfermedades complejas depende tanto de la predisposición genética como de la exposición a factores ambientales, por esta razón, además de prestar atención a las interacciones gen-gen, hay que tener en cuenta a las interacciones gen-ambiente, ya que probablemente contribuyan de forma importante modulando la susceptibilidad a sufrir la enfermedad. Sin embargo, hoy en día se conoce muy poco sobre los mecanismos subyacentes a estas interacciones. Lee y sus colaboradores estudiaron recientemente cómo las variantes genéticas comunes eran capaces de modular las respuestas mediadas por patógenos en las células dendríticas humanas, a través de la cuantificación de la respuesta de las células dendríticas frente a distintos patógenos en una serie de individuos genotipados<sup>[109]</sup>. Sus resultados apuntan a la existencia de abundantes interacciones del ambiente con los genes, revelan alelos comunes capaces de explicar la variación interindividual

en la sensibilidad a patógenos, y proporcionan nuevos datos funcionales sobre variantes genéticas que alteran la susceptibilidad al desarrollo de enfermedades inflamatorias<sup>[109]</sup>.

## 2.4 Genes en la región HLA

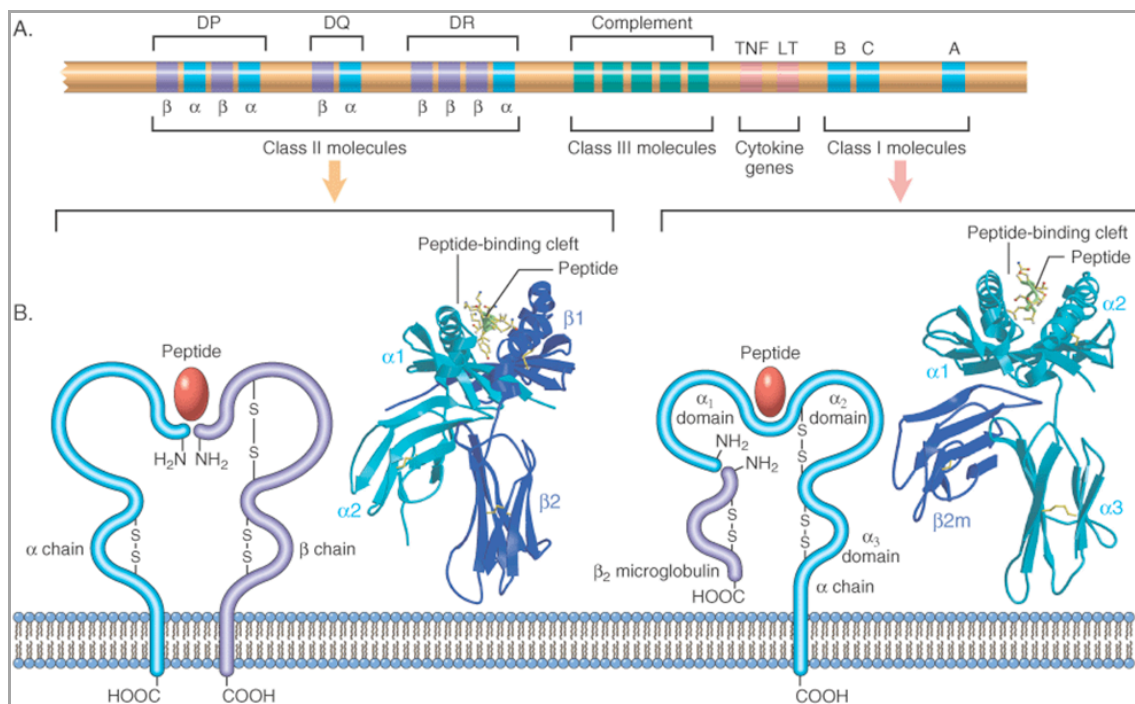
Los genes de la región HLA están localizados en el brazo corto del cromosoma 6, en la región de alrededor de 4Mb perteneciente al MHC. Codifican para glicoproteínas de la superficie celular altamente polimórficas (algunas de las cuales tienen un papel crucial en el reconocimiento de antígenos propios y no propios por el sistema inmune), y se organizan en tres regiones<sup>[110]</sup> (Fig.5):

-MHC de clase I: presenta péptidos antigénicos a las células T CD8+. Se conocen unos 20 genes HLA de clase I, siendo los más importantes los llamados genes HLA clásicos (*HLA-A*, *-B* y *-C*), aunque también se encuentran los genes HLA no clásicos (*HLA-E*, *-F* y *-G*), y los genes no codificantes o pseudogenes (*HLA-S*/17, *-X*, *-N*/30, *-L*/92, *-J*/59, *-W*/80, *-U*/21, *-K*/70, *-16*, *-H*/54, *-90* y *-75*)<sup>[110]</sup>.

-MHC de clase II: presenta péptidos antigénicos a las células T CD4+. Existen cinco familias: *HLA-DM*, *-DO*, *-DP*, *-DQ* y *-DR*. Funcionalmente tienen un papel muy importante, debido a que se expresan en la superficie de células presentadoras de antígeno con el fin de presentar péptidos a las células T CD4+, cuya estimulación induce la producción de anticuerpos por las células B<sup>[110]</sup>.

-MHC de clase III: contiene otra gran variedad de genes, algunos relacionados con el sistema inmune, como son *TNFA* (factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ), *C2* (componente del complemento 2), *C4A* (componente del complemento 4A), *C4B* (componente del complemento 4B), *CFB* (factor de complemento B), *MSH5* (homólogo de mutS 5), *SKIV2L* (helicasa SKIV2L), *CREBL1* (proteína de unión 1 al elemento de respuesta CAMP), *MICB* (polipéptido relacionado con la secuencia B, MHC clase I) y *OR2H2* (receptor olfatorio 2H2)<sup>[110]</sup>.





**Figura 5.** Genes HLA y estructura de las moléculas MHC de clase II y I ([intranet.tdmu.edu.ua](http://intranet.tdmu.edu.ua))

Desde que fuese descubierto en 1970 a través de estudios de gen candidato, y durante más de 3 décadas, la región perteneciente al MHC en el cromosoma 6q21 fue el único locus de riesgo conocido frente a la EM<sup>[98]</sup>. Hoy en día, a pesar de que han sido descubiertos nuevos alelos relacionados con la susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad, el alelo *HLA-DRB1\*15:01* continúa siendo el principal gen de susceptibilidad relacionado con la EM. Dicho alelo es portado por el 28-33% de los pacientes Norte Caucásicos comparado con el 9-15% de los pacientes controles, con una OR de 3.08. Además, tiene una baja incidencia entre los individuos sanos indígenas Sami (nativos de la parte norte de las regiones Escandinavas) coincidiendo con una baja prevalencia de EM, lo que sugiere un riesgo genético general reducido para EM en esa población<sup>[98]</sup>.

Se ha descrito además un alto grado de heterogeneidad alélica del locus *HLA-DRB1* en Caucásicos<sup>[111]</sup>, mostrando que la variación en esta región influye en la susceptibilidad a desarrollar EM de una manera compleja<sup>[98]</sup>. Otros alelos dentro de la región HLA de clase II que también han sido descritos asociados con la susceptibilidad a la EM, son el alelo *HLA-DRB1\*13:03* que se identificó también en el GWAS con una OR de 2.43; y los alelos *HLA-DRB1\*01:08* (OR=1.18) y *HLA-DRB1\*03:01* (OR=1.26)<sup>[98]</sup>.

El alelo *HLA-DRB1\*15:01* forma parte de las moléculas MCH de clase II, codifica para glicoproteínas expresadas en células presentadoras de antígeno (CPAs), como células dendríticas, macrófagos y células B, y presenta péptidos procesados a las células T CD4+. Podría afectar a la presentación de antígenos frente a células T CD4+ auto-reactivas o de reacción cruzada, provocando bien la consecuente activación y expansión, bien la muerte

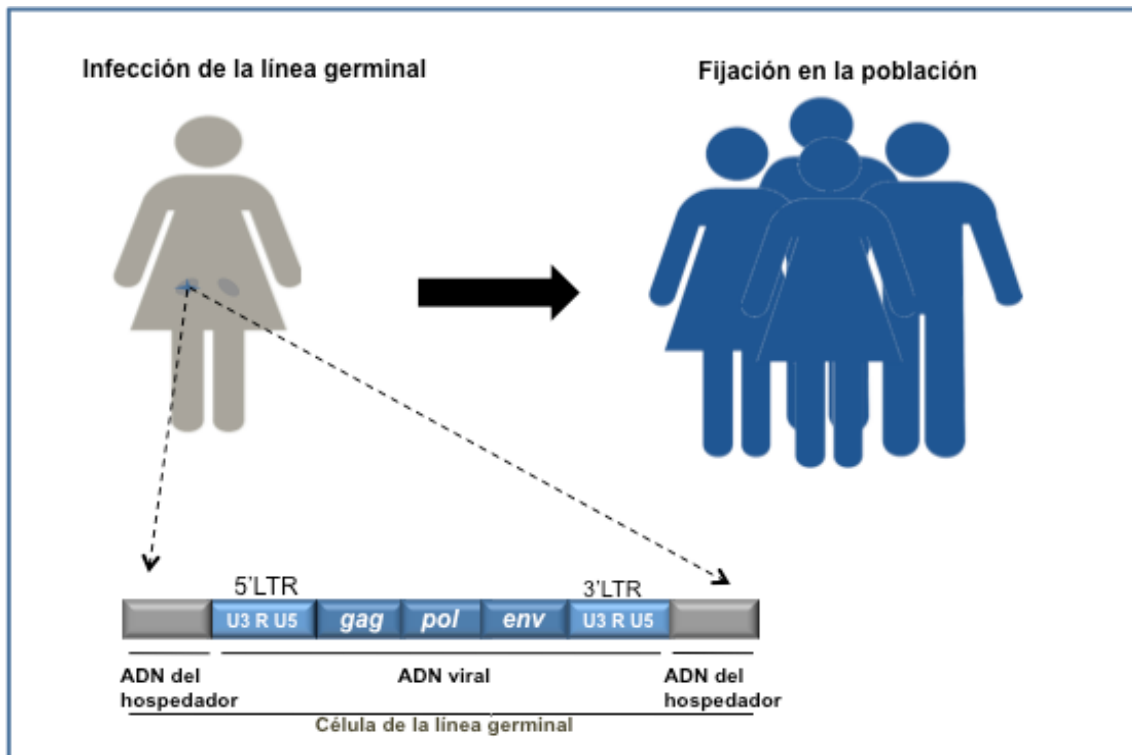
celular inducida<sup>[112]</sup>. A pesar de que los mecanismos exactos por los que estos alelos afectan a la susceptibilidad de la EM permanecen sin ser descubiertos, se han hipotetizado distintas vías a través de las cuales, el haplotipo DR2 (*DRB1\*15:01*, *DRB5\*01:01* y *DQB1\*06:02*) podría conferir riesgo a EM<sup>[112]</sup>.

- a) Escape a la depleción tímica: Una baja afinidad de interacción entre el péptido y la molécula MHC podría permitir a las células T con TCRs de alta afinidad auto-reactiva escapar de la depleción tímica, y estas T auto-reactivas podrían activarse en la periferia<sup>[112]</sup>.
- b) Ciertas moléculas de clase II pueden presentar preferencialmente autoantígenos: la unión competitiva de péptidos por las moléculas MHC de Clase II puede influenciar la presentación relativa de un péptido autoantigénico favoreciendo una respuesta auto-reactiva en un ambiente inflamatorio permisivo<sup>[112]</sup>.
- c) Mimetismo molecular: las moléculas MHC de clase II en conjunto con péptidos autoantigénicos y microbiales pueden presentar caras estructuralmente equivalentes para el reconocimiento por TCRs, facilitando un reconocimiento inapropiado de autoantígenos<sup>[112]</sup>.
- d) Modos sub-óptimos de unión al TCR: ciertos péptidos pueden ser reconocidos por TCRs con modos de unión sub-óptimos. Esto puede contribuir al escape de la depleción tímica por parte de linfocitos T auto-reactivos<sup>[112]</sup>.

### 3 HERVs

#### 3.1 Introducción

Los retrovirus endógenos humanos (HERVs) son “parásitos genéticos” del genoma de los vertebrados<sup>[113]</sup>. Proviene de la infección llevada a cabo por retrovirus exógenos hace millones de años; sin embargo, su existencia en mamíferos es conocida desde 1970<sup>[114]</sup>. Durante una infección, los retrovirus exógenos tienen la capacidad de integrar una copia de su genoma (provirus) en el genoma nuclear de la célula infectada como parte de su ciclo de vida, permitiendo una asociación permanente entre el parásito y el hospedador, y una transmisión horizontal con la creación de nuevos viriones. Normalmente los retrovirus solo infectan a células somáticas, por lo que los genes retrovirales se integran en un ADN genómico que no llega a heredarse, pero puede ocurrir que los retrovirus infecten a una célula perteneciente a la línea germinal del individuo; en ese caso, integran su ADN en el genoma celular y pasan a heredarse de generación en generación de manera mendeliana en forma de retrovirus endógenos (ERVs)<sup>[113, 115, 116]</sup> (Fig. 6). Se denominan HERVs cuando se refieren específicamente a los ERVs presentes en el genoma de los seres humanos.



**Figura 6. Proceso de endogenización de HERVs.** En el caso de que el retrovirus exógeno infecte a una célula perteneciente a la línea germinal del individuo, empezará a transmitirse de generación en generación de forma mendeliana, hasta conseguir fijarse en la población y pasar a formar parte de todos los individuos que la componen.

El proceso de endogenización impacta profundamente en la supervivencia y evolución tanto del virus como del hospedador; requiere que los HERVs superen los mecanismos de defensa antivirales del hospedador, infecten las células germinales sin provocar citotoxicidad en ellas, y permanezcan siendo lo suficientemente no patogénicos como para que la progenie del hospedador sea capaz de reproducirse<sup>[117]</sup>. De este modo, una transmisión vertical exitosa asegura tanto una vigilancia inmune disminuida como una virulencia disminuida de estos virus. Además, la expresión de los HERVs cambia de forma importante con respecto a los retrovirus exógenos, ya que a partir de este momento todas las células del hospedador pasan a ser portadoras de un provirus integrado<sup>[117]</sup>.

Aunque la inserción retroviral es aleatoria, en el sentido de que no existe un sitio específico del genoma donde deba insertarse, las integraciones son más frecuentes en sitios del genoma ricos en genes o transcripcionalmente activos debido al nivel de empaquetamiento del ADN<sup>[117]</sup>. Actualmente, el colectivo de genomas procedentes de los HERVs representa del 8 al 10% del genoma humano<sup>[118]</sup>, agrupados en alrededor de 31 familias multigénicas independientemente adquiridas<sup>[119]</sup>. Aunque no existe una nomenclatura estándar para los HERVs, se ha adoptado una clasificación basada su homología con diferentes grupos de retrovirus exógenos. De esta forma, las secuencias HERVs agrupadas con retrovirus Gamma y Épsilon son los llamados de “Clase I”, y representan la mayoría de las secuencias; seguidos por los agrupados con retrovirus Beta de nominados de “Clase II”, y por los grupos con mayor homología con los Espumavirus, conocidos como “Clase III”<sup>[120, 121]</sup>. El nombre de los grupos individuales viene dado generalmente por “HERV” seguido de la letra del aminoácido correspondiente al ARNt que actúa como cebador al iniciarse la transcripción reversa (dicho ARNt se une al sitio de iniciación de la transcripción o *primer binding site* en inglés); así, en el caso de tratarse de un retrovirus infeccioso, la familia HERV-W usaría un ARNt triptófano, mientras que los miembros de la familia HERV-K utilizarían un ARNt lisina (Tabla 1).

El genoma retroviral de base está compuesto por tres genes principales, *gag*, *pol* y *env*, flanqueados por regiones reguladoras LTRs (long terminal repeats)<sup>[122]</sup>. Cada LTR contiene una región 3' única (3U), una región repetida (R), y una región única 5' (5U); y son usadas por los provirus integrados como promotores virales regulando la transcripción de ARN<sup>[117]</sup>. El gen *gag* codifica para las proteínas necesarias para el ensamblaje viral, incluyendo las proteínas de la nucleocápside, de la matriz y de la cápside; el gen *pol* codifica para las enzimas necesarias para la replicación viral, como la transcriptasa reversa, la proteasa, la ribonucleasa y la integrasa; y por último está el gen *env* que codifica para una glicoproteína compuesta por una subunidad de superficie que interacciona con la célula huésped, y una subunidad transmembrana<sup>[122]</sup>. Estas últimas son esenciales para la unión del virus a las membranas de la superficie celular y han sido asociadas específicamente con neurovirulencia.

**Tabla 1.** Clasificación de las principales familias de HERVs. Gonzalez Fernandez 2006<sup>[123]</sup>

Nombre	PBS	Organización	Longitud (kb)	Número de copias
<i>Clase I</i>				
HERV-E	Glu	LTR-gag-pol-env-LTR	8,8	35-85
HERV-F	Phe	LTR-gag-pol-env	7,1	1
HERV-H	His	LTR-gag-pol-env-LTR	8,7	660
HERV-I	Ile	LTR-gag-pol-env-LTR	9,0	25-85
HERV-P	Pro	LTR-gag-pol-env-LTR	8,2	20-100
HERV-R	Arg	LTR-gag-pol-env-LTR	9,9	10-15
HERV-W	Trp	LTR-gag-pol-env-LTR	7,6	15-115
ERV-I	?	gag-pol-env-LTR	3-4	1-15
ERV-9	Arg	LTR-gag-pol-env-LTR	9,6	40-70
HRES-1	His?	LTR-gag-Δpol	6	1
RRHERV-1	Ile	LTR-gag-Δpol-LTR	3,3	15-20
S71	?	gag-Δpol-env-LTR	5,4	1-20
<i>Clase II</i>				
HERV-K	Lys	LTR-gag-pol-env-LTR	9,2	170
HERV-L	Leu	LTR-gag-pol-ΔLTR	6,5	200-575
HERV.HML6	Lys	LTR-gag-Δpol-env-LTR	7,5	30-45
<i>Clase III</i>				
HERV-L	Leu		6,5	575
HERV-S	Ser	LTR-gag-pol-env-LTR	6,7	70
HERV-U2	?	LTR-gag-pol-env-LTR		?
HERV-U3	?			?

(PBS: *Primer binding site* o sitio de inicio de la transcripción)

Sin embargo, de entre todos los elementos HERVs presentes en nuestro genoma, pocos loci codifican proteínas e incluso un número menor contiene provirus intactos. La mayoría de los HERVs están incompletos debido a la acumulación de mutaciones o a eventos de recombinación que afectan a varios dominios y/o a los LTRs.

Bajo condiciones homeostáticas, la mayoría de HERVs poseedores de LTRs funcionales se encuentran en estado latente debido al silenciamiento de los provirus en la cromatina, llevado a cabo a través de modificaciones epigenéticas del ADN, tales como metilación o superenrollamiento del ADN. Dichas modificaciones epigenéticas pueden verse alteradas tanto por la edad como por la enfermedad. En el caso específico de copias de la familia HERV-K, se ha observado una variación en el estado de metilación con la edad, describiéndose una pérdida de metilación durante las edades comprendidas entre 40 y 63 años, y entre 64 y 83 años<sup>[124]</sup>.

Como excepción, existen casos específicos de HERVs que han sido seleccionados por la evolución debido a que sus funciones biológicas podrían ser beneficiosas para el hospedador. En estos casos se observa una “domesticación” del gen HERV para ser usado por el organismo<sup>[125]</sup>. Dentro de este grupo encontramos genes como la *sincitina-1* y la *sincitina-2*, pertenecientes a las familias HERV-W y HERV-FRD respectivamente<sup>[126]</sup>. Estas proteínas son altamente fusogénicas, y se requieren para la formación de la placenta permitiendo la fusión de células para formar el sincitiotrofoblasto (membrana placentar que separa los tejidos maternos

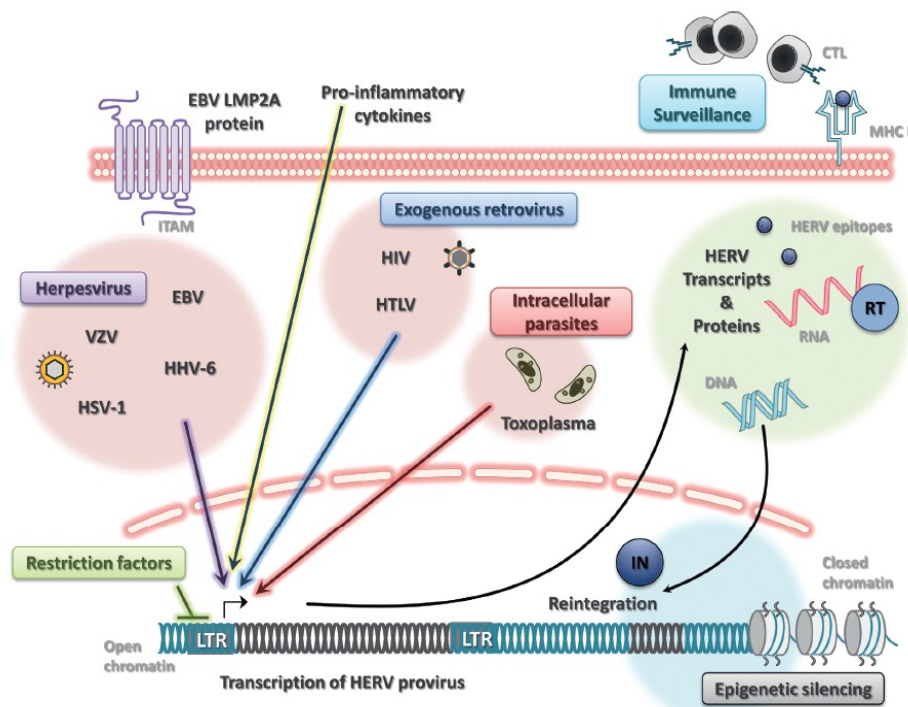
de los pertenecientes al feto), y contribuyendo a la tolerancia inmune del feto<sup>[126]</sup>. La adaptación y evolución de las secuencias de HERVs en el genoma de los mamíferos resulta en un dualismo entre la adquisición de nuevas funciones celulares y la virulencia de esos retrovirus.

Aparte de estos HERVs “domesticados”, existen estudios que muestran que no todos los HERVs permanecen como pasajeros silentes, sino que se ha observado reactivación de HERVs específicos asociada con varios tipos de cáncer<sup>[127-133]</sup>, enfermedades autoinmunes como EM, Artritis Reumatoide (AR)<sup>[134]</sup>, Psoriasis<sup>[135]</sup>, o Lupus Eritematoso Sistémico<sup>[136]</sup>, y otras enfermedades como la esquizofrenia<sup>[117, 137]</sup>. Sin embargo, hasta la fecha se desconoce si dicha reactivación o aumento de expresión en condiciones patológicas se debe a un efecto causal o si, al contrario, estarían aumentados como una consecuencia subyacente a la enfermedad.

Como se ha dicho anteriormente, estos HERVs forman parte de las regiones repetitivas del genoma que fueron consideradas como “ADN de unión o basura” al pensarse que tenían poco o ningún papel fisiológico. Sin embargo, hoy en día se sabe que estas secuencias no bien estudiadas hasta la fecha pueden tener un papel importante tanto transcribiéndose como funcionando como elementos reguladores. Además, tal y como ocurre con el resto de los genes del organismo, los HERVs también pueden poseer polimorfismos que podrían afectar a la expresión de un producto determinado. Los polimorfismos de secuencia podrían afectar a la función de un producto expresado, y de hecho se conocen casos donde alelos específicos de un mismo elemento HERV pueden estar relacionados con un efecto protector o con una mayor susceptibilidad frente al desarrollo de la EM<sup>[138-140]</sup>. Esto podría proporcionarnos una explicación al hecho de que una secuencia ubicua como son los HERVs, pudiese causar una enfermedad solo en una proporción de individuos. Sin embargo, se han descrito muy pocos polimorfismos, debido en gran parte a la dificultad para identificarlos entre el *background* de provirus muy similares.

### 3.2 Posibles mecanismos de expresión de los HERVs

Bajo condiciones homeostáticas, la mayoría de los HERVs poseedores de LTRs funcionales se encuentran en estado latente debido al silenciamiento epigenético de los provirus en la heterocromatina, manteniéndola en un estado inaccesible a la maquinaria transcripcional<sup>[117]</sup>. Sin embargo, hay muchos factores que pueden interferir en la expresión de los HERVs, entre los que se encuentran la recombinación homóloga con otros HERVs o retrovirus exógenos, los desencadenantes ambientales, los factores de transcripción y el contexto epigenético de los provirus HERVs (Fig. 7).



**Figura 7. Posibles desencadenantes de expresión de los HERVs.** La expresión de los HERVs puede verse alterada, tanto por agentes infecciosos como herpesvirus o retrovirus exógenos, como por parásitos intracelulares, factores de transcripción o mecanismos epigenéticos. Douville and Nath, 2014.

#### a) Eventos de recombinación

Pueden surgir retrovirus replicación-competentes como resultado de eventos de recombinación entre dos o más HERVs replicación-defectivos, consiguiendo restaurar sus respectivos defectos. La frecuencia con la que puede ocurrir es muy baja debido a la naturaleza aleatoria de recombinación entre genomas retrovirales compactados y el grado de defectos genéticos adquiridos por los HERVs. No obstante, un estudio reciente en ratón apunta que esta frecuencia está aumentada considerablemente en ciertos tipos de inmunodeficiencias<sup>[141]</sup>; y se ha demostrado que la recombinación in vitro entre 3 provirus HERV-K defectivos da lugar a un retrovirus infeccioso<sup>[142]</sup>. De esta manera, estas secuencias virales, incluso silenciadas o truncadas como consecuencia de codones stop, pueden ser capaces de expresarse<sup>[122]</sup>.

#### b) Agentes infecciosos

Una posible explicación para la expresión preferencial de HERV encontrada en muestras patológicas de cerebros humanos sería el tropismo de ciertos desencadenantes ambientales como virus y bacterias hacia componentes del SNC. Patógenos neuro-trópicos o neurovascular-trópicos como herpesvirus<sup>[140, 143]</sup>, *Toxoplasma gondii*<sup>[137]</sup>, y ciertas cepas del virus influenza<sup>[144]</sup> pueden cruzar la BHE hacia el SNC<sup>[117]</sup>. Normalmente, una vez en el SNC, llevarían a una infección abortiva al ser interceptados por macrófagos cerebrales y quedar inhibida su replicación; sin embargo, esto no impediría la expresión de sus genes IE

(*immediate-early*) causando transactivación de las copias HERV-W, por lo que su presencia transitoria en el SNC podría ser suficiente para desencadenar una expresión de HERVs<sup>[116]</sup>. Los herpesvirus constituyen uno de los mejores candidatos, ya que pueden ser neurotrópicos, permanecer latentes y ser reactivados, y se ha hipotetizado que éstos también podrían inducir la expresión de HERVs durante eventos tempranos en la replicación, a través de la desmetilación del ADN, la expresión de proteínas transactivadoras, o una señalización celular aberrante<sup>[117]</sup>. Además, se ha observado expresión de los epítomos de Env en la superficie de células B y de monocitos, lo que podría ser una consecuencia de la relación especial entre HERVs y herpesvirus<sup>[145]</sup>. Esto apunta a que los herpesvirus podrían jugar un papel dual en las enfermedades neurodegenerativas, por un lado actuando como entidades patológicas *per se*, y por otro como inductores de HERVs<sup>[117]</sup>. Cabe destacar dentro de este grupo, a virus que han sido relacionados de forma importante con la enfermedad, como el herpesvirus humano 6 (HHV6)<sup>[146, 147]</sup> o el VEB<sup>[148-150]</sup>.

c) Factores de transcripción

La regulación de la expresión y de la replicación de HERVs por diferentes familias de factores de transcripción es un componente importante de la inmunidad innata antiviral. Tanto en el caso de HERV-K como de HERV-W se han descrito distintos sitios de unión en el promotor para factores de transcripción como el NF-κB<sup>[151, 152]</sup>, lo que podría resultar en una expresión incrementada durante inflamación. Otros factores de transcripción incluyen los miembros de la familia TRIM, como TRIM5α, que puede restringir la expresión de ciertos ERVs primates no encontrados en humanos<sup>[153]</sup> y retrovirus exógenos como HIV-1<sup>[154]</sup>.

d) Contexto epigenético

Tanto el estado de la cromatina como el estado de metilación de las islas CpG del promotor de HERV y de las regiones reguladoras parecen ser un factor crucial para el control de la expresión de los HERVs<sup>[155, 156]</sup>, jugando un papel importante como parte del sistema de defensa genómico frente a posibles efectos potenciales de secuencias insertas. Los estudios publicados hasta la fecha sugieren que los provirus y los LTRs solitarios están densamente metilados bajo circunstancias normales fisiológicas, pero hipometilados en la placenta<sup>[155, 156]</sup>. De tal manera que una hipometilación del ADN podría llevar a la reactivación de retroelementos.

### 3.3 Mecanismos de patogenicidad de los retrovirus endógenos

A pesar de que la mayoría de las copias insertas en nuestro genoma corresponden a copias defectivas, algunas de ellas podrían conservar el potencial de causar o contribuir a la enfermedad con mecanismos de patogenicidad distintos a los iniciales<sup>[157]</sup>. Así pues, tanto



como elemento genético como patógeno viral, los HERVs podrían alterar la función celular en multitud de vías<sup>[117]</sup>.

a) Disrupción de genes en su sitio de integración

Los HERVs, al igual que otros elementos génicos como los retrotrasposones, tienen la capacidad de experimentar transposición, recombinación y ciclos de integración. Algunas familias HERVs que se encuentran en alto número de copias en el genoma humano, como HERV-K, se cree que se han extendido a través de la reintegración de un provirus ya presente. Sin embargo, cada evento de nueva integración que ocurre en un individuo, incrementa el riesgo de que ocurra una inserción dañina, llevando a una eliminación de un gen celular (*knockout*) o a daño del ADN a través de eventos de recombinación; por ejemplo, se han identificado integraciones de HERV-K en los genes supresores de tumores BRCA2 y en el gen reparador XRCC1<sup>[117, 158]</sup>. Además, los HERVs que se han integrado en intrones pueden proporcionar sitios alternativos de iniciación o terminación de la transcripción, dando lugar a transcritos de ARNm génicos truncados del hospedador.

b) Modulación de la expresión de genes adyacentes o distales de la célula hospedadora

Algunos HERVs pueden conservar secuencias reguladoras que pueden actuar como promotores funcionales, *enhancers* o señales de poliadenilación, pudiendo modificar la expresión de genes adyacentes<sup>[116]</sup>. Además, también pueden formar parte del grupo de ARNs reguladores: podrían ser responsables de la regulación transcripcional de ARNlinc (grandes ARNs no codificantes intercalados), que se piensa que desempeñan una función importante en la regulación del genoma contribuyendo a una red reguladora compleja de la expresión génica<sup>[157]</sup>. Un estudio muestra que alrededor del 80% de los ARNlinc contenían elementos retrotransponibles, enriquecidos particularmente en HERVs insertados en el sitio de inicio de la transcripción de ARNlinc<sup>[157, 159]</sup>.

c) Modulación de la respuesta inmune por ácidos nucleicos y proteínas

Los productos de expresión de HERVs tienen el efecto potencial de interactuar con componentes de la respuesta inmune innata y activar vías de señalización pro-inflamatorias. Por un lado existen evidencias de una interacción directa entre ciertas proteínas HERVs y TLRs<sup>[160, 161]</sup>, y por otro, los ácidos nucleicos de HERVs podrían activar receptores de reconocimiento de patrones (PRRs) citosólicos. En el caso de los HERVs, una expresión incrementada de ARN, o la presencia de ADNc libre en un compartimento no familiar (como el citosol), puede resultar en la activación de PRRs<sup>[162]</sup>. La coevolución con retroelementos endógenos podría haber moldeado la sensibilidad de los sensores de ADN del sistema inmune innato aumentando el umbral de detección de ácidos nucleicos para evitar el desarrollo de una respuesta inmune frente a ADNc de retrovirus endógenos, cuyos niveles se mantendrían controlados gracias al producto de genes como *Trex1* o *SAMHD1*<sup>[162]</sup>. Una mutación de pérdida de función en alguna de estas enzimas podría provocar la acumulación

de ADNc derivado de HERVs, con la consecuente activación de los sensores de ADN. Esto provocaría una respuesta inmune de tipo crónico, con liberación patogénica de IFN de tipo I y de mediadores inflamatorios, similar a la subyacente a enfermedades autoinmunes<sup>[162]</sup>. Además, la necesidad de ignorar niveles bajos de ADNc de retroelementos podría proporcionar una oportunidad a los retrovirus exógenos de mantener una copia de su genoma de ADN dentro de las células durante una infección latente, sin provocar una respuesta inmune.

Por otro lado, de forma similar a lo que ocurre con el resto de proteínas del hospedador, las proteínas HERVs expresadas proporcionarán inevitablemente epítopos antigénicos reconocidos por células T y B, y ciertas secuencias *env* de HERV pueden codificar superantígenos (SAg) que pueden provocar la activación policlonal independiente de antígeno de cualquier linfocito T que posea una cadena  $\beta$  variable (TCR V $\beta$ )<sup>[157]</sup>, de forma que podría resultar en una activación anormal de linfocitos T autorreactivos<sup>[163]</sup>. Alternativamente, existen evidencias de que ciertas proteínas HERV Env podrían ser inmunosupresoras<sup>[164, 165]</sup>, impidiendo potencialmente la respuesta inmune a patógenos exógenos y tumores<sup>[162]</sup>.

#### d) Ayuda retroviral para células B

Los HERVs también podrían movilizar las células B para que produzcan anticuerpos de manera rápida contra antígenos patogénicos<sup>[166]</sup>. Los polisacáridos bacterianos y las glicoproteínas virales son antígenos capaces de provocar una respuesta de células B de manera independiente a la activación de células T. Se denominan antígenos timo-independientes (TI), y pueden ser de dos tipos, TI-1 o TI-2. Los antígenos TI-2 causan un gran entrecruzamiento de muchos receptores BCR de la célula B, provocando que dichas células se diferencien rápidamente a células plasmáticas y secreten anticuerpos IgM e IgG<sup>[167]</sup>. A pesar de los avances recientes, el mecanismo por el que los antígenos TI-2 activan células B en la zona marginal sin la ayuda de células T permanece aún poco entendido. Se ha descrito recientemente que el entrecruzamiento de los BCR por antígenos TI-2 activa una cascada de señalización intracelular que incluía a la quinasa tirosina de Bruton (BTK) y al factor de transcripción nuclear NF-K $\beta$ , permitiendo la transcripción de ADN endógeno retroviral. El ARN retroviral activaría a las células B a través de dos vías distintas pero complementarias: por un lado el ARN viral activaría un sensor de ARN llamado “gen inducible por ácido retinoico 1” (RIG-1) resultando en una señalización a través del adaptador mitocondrial antiviral (MAVS); y por otro, el ARN viral sería retrotranscrito a ADN, activando un sensor llamado cíclica GMP-AMP sintetasa (cGAS) (Fig. 8). En último lugar, las señales procedentes de estos sensores promueven la activación y expansión de células B Ag-específicas, que consecuentemente se diferencian en células plasmáticas secretoras de anticuerpos<sup>[166, 167]</sup>.



**Figura 8. Ayuda retroviral para células B.** La activación del BCR por antígenos TI-2 conduce a la expresión de HERVs, cuyo ARN, tanto a través de la activación de los receptores MAVS localizados en la mitocondria, como a través de su retrotranscripción a ADNc y la activación de los receptores STING situados en el retículo endoplásmico, llevaría a la activación de la expresión génica y a la creación de anticuerpos de forma rápida e independiente a la activación de células T.

### 3.4 HERVs y EM

La primera vez que se descubrieron partículas retrovirales con actividad retrotranscriptasa en cultivos primarios de pacientes con EM, se especuló que se tratara del virus linfotrófico de células T de tipo 1 (HTLV-1) debido a las similitudes clínicas existentes entre la paraparesis espática tropical (una enfermedad desmielinizante progresiva) causada el HTLV-1 y la EM. Tras los primeros análisis, los retrovirus exógenos pasaron a un segundo plano, y el principal candidato retroviral asociado a la EM pasó a ser el miembro fundador de la familia multicopia HERV-W, el MSR/V (*Multiple Sclerosis Associated Retrovirus*), fijándose la atención sobre los HERVs en general<sup>[168]</sup>. A partir de entonces han sido muchos los estudios que han relacionado los HERVs con la EM<sup>[138-140, 152, 169-174]</sup>.

Apoyando al posible papel de los HERVs en la EM, está el hecho de que existan retrovirus exógenos relacionados con ERVs que continúan siendo agentes infecciosos, como el retrovirus jaagsiekte que causa cáncer de pulmón en ovejas<sup>[175]</sup>, o el virus de la leucemia felino, que causa leucemia y linfomas en gatos<sup>[176]</sup>.

Pero la EM no es la única enfermedad que ha sido relacionada con los HERVs, la tabla 2 muestra las distintas familias de HERVs que han sido relacionadas con distintas enfermedades:

**Tabla 2.** Familias HERVs previamente asociadas con distintas enfermedades. Modificada de Douville and Nath, 2014

Familia	Enfermedad	Desencadenantes de expresión conocidos	Contribución patogénica
HERV-W	EM Esquizofrenia Infección VIH Osteoartritis	Herpesvirus (Proteínas IE: Oct-1) Factores de transcripción (NF-KB) Toxoplasma Citokinas proinflamatorias	Env pro-inflamatoria (IL1, IL6, TNFα, IFNγ, IL8, ↑ICAM) Env SAg Env Interferencia en la diferenciación de OPCs (iNOS) Env altera la función glial (sobre-expresión BDNF)
HERV-F	EM	Agentes demetilantes	Env SAg
HERV-K	EM ELA Infección VIH Esquizofrenia Diabetes tipo1 Artritis juvenil Osteoartritis Cáncer	VEB HTLV-1 Herpesvirus IFN tipo I Factores de transcripción (NF-KB, MTF-M)	Env SAg Neoepítomos para CTLs Nuevas inserciones: disrupción genes
HERV-H	Síndrome de microdelección 3q13.31	-NA-	Delección génica mediada por recombinación Env posee potencial inmunosupresor
HERV-E	Lupus	Demetilación	Env posee potencial inmunosupresor
HERV-P	Cancer de mama	Desconocido	Desconocido

### *HERVs como objetivos de futuros tratamientos terapéuticos*

El hecho de observarse una reactivación de la expresión de HERVs en distintas enfermedades autoinmunes<sup>[134-136, 138, 140, 145, 146, 152, 170-172, 177-186]</sup> y en distintos tipos de cáncer<sup>[127-133]</sup>, junto con la disminución de los niveles de expresión en pacientes tratados satisfactoriamente ya sea con distintos tratamientos inmunomoduladores<sup>[187, 188]</sup> o quimioterapia<sup>[189]</sup>, hace que el papel patogénico potencial de los HERVs se convierta en diana de estudio para el desarrollo de nuevas aproximaciones terapéuticas.

En el caso de la EM, se han investigado los posibles efectos neuroprotectores de la utilización de un anticuerpo monoclonal humanizado anti-Env-SU MSRV/HERV-W<sup>[190-193]</sup>, GNbAC1, como forma de terapia en individuos con EM. Ya han sido publicados los resultados del ensayo clínico de fase IIa<sup>[192]</sup>, se ha observado que el tratamiento con GNbAC1 bloquea la transcripción de genes pro-inflamatorios mediada por Env, a la vez que previene la formación de nitrotirosina restaurando la diferenciación de células precursoras de oligodendrocitos<sup>[190]</sup>. Además confiere ventajas frente a otros tratamientos de la EM, ya que los pacientes conservan

toda su capacidad inmune. Este mismo tratamiento se encuentra en distintas fases de ensayo con otras enfermedades como son la diabetes o la esquizofrenia.

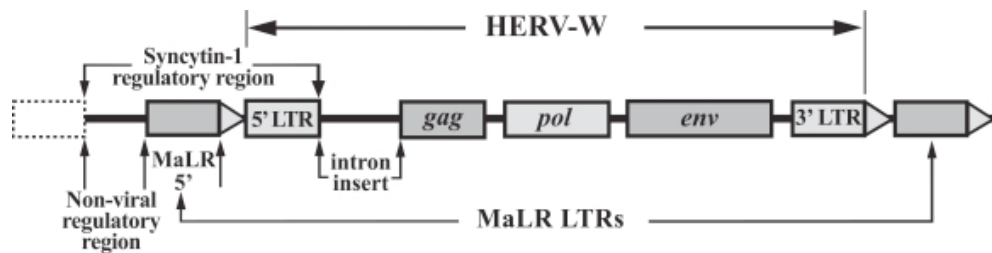
### 3.5 Familias de HERVs estudiadas

#### 3.5.1 HERV-W

La familia de HERV-W es una familia multicopia con alrededor de 650 loci que forman parte del genoma humano<sup>[184]</sup>, comprende un total de 311 copias (provirus más o menos completos o pseudogenes) dispersas en el genoma humano, junto con 343 LTRs de HERV-W adicionales<sup>[194]</sup>.

Codifica, entre otras, para una proteína de la envuelta que actúa como un potente agente inmunopatogénico, activando una cascada proinflamatoria y autoinmune a través de la interacción con el TLR-4 (Toll-like receptor) en las CPAs<sup>[116]</sup>. Dicha proteína ha sido relacionada con distintas enfermedades, entre las que destacan la EM<sup>[145, 179, 195, 196]</sup> y la esquizofrenia<sup>[197, 198]</sup>. Sin embargo, no se han encontrado diferencias significativas en la expresión de transcritos de HERV-W en tumores (colon, hígado, útero, mama y estómago) frente a la existente en tejidos normales adyacentes.

Solo el locus ERVWE1 de HERV-W, situado en la posición 7q21, codifica para una proteína completa denominada Sincitina-1. Se sabe que este locus contiene un HERV-W completo, con genes *gag*, *pol* y *env* flanqueados por los LTRs. Además, en este caso concreto, el genoma viral está flanqueado por LTRs aislados de un segundo retrovirus endógeno de la familia MaLR<sup>[122]</sup>. Mientras que los genes *gag* y *pol* han sido silenciados por deleciones y codones stop, el gen *env* se ha conservado en humanos, chimpancés, gorilas y orangutanes. La Sincitina-1 es una glicoproteína de membrana altamente fusogénica, responsable de la implantación del trofoblasto en los mamíferos euterianos<sup>[126]</sup>. Su expresión es promovida por una región reguladora que comprende el LTR en 5' de HERV-W, también selectivamente conservado, y la secuencia LTR en 5' de MaLR<sup>[122]</sup> (Fig.9). Por lo tanto, tenemos un gen viral en la unidad estructural de un genoma viral, regulado de forma importante por dos LTRs virales, que expresan una proteína viral conservada esencial para la reproducción humana normal<sup>[122]</sup>.



**Figura 9. Estructura del locus ERVWE1 de HERV-W**, situado en la posición 7q21 y codificante para la Sincitina-1. En este caso, además de estar regulado por su LTR 5' correspondiente, se encuentra adicionalmente regulado por el LTR en 5' de MaLR. Ryan 2011

Se ha observado que dicho gen exhibe una expresión glial incrementada en lesiones desmielinizantes agudas de EM; y se ha mostrado *in vitro* que esta sobreexpresión glial de sincitina induce estrés en el retículo endoplásmico de los astrocitos, permitiendo neuroinflamación e inducción de radicales libres, que resulta en citotoxicidad y muerte de oligodendrocitos<sup>[178, 199]</sup>. Estudios en células astrocíticas humanas U-87MG muestran que la exposición a citoquinas del tipo TNF $\alpha$ , INF $\gamma$ , IL6 e IL1 activan el promotor de ERWE1, mientras que INF $\beta$  lo inhibe, lo que sugiere un posible papel de la sincitina-1 en la EM<sup>[182]</sup>.

### HERV-W y EM

En 1989 se observó por primera vez la presencia de un retrovirus desconocido con actividad retrotranscriptasa en un cultivo de células leptomeningeas (LM7) procedentes del LCR de un paciente con EM<sup>[200]</sup>. El posterior aislamiento e identificación molecular dio a conocer un nuevo elemento retroviral al que se llamó MSRV, fundador de la familia HERV-W<sup>[201]</sup>. La microscopía electrónica mostró la morfología típica de un retrovirus, sin embargo, los autores no sabían si estaba relacionado con un retrovirus exógeno infeccioso o con un virión HERV capaz de replicarse de forma competente. La amplificación y caracterización molecular de las secuencias encontradas relacionadas con MSRV, reveló que las secuencias *gag* y *pol* estaban relacionadas con oncovirus del tipo C, mientras que las secuencias del tipo *env* eran más parecidas a las del tipo D. Además, se identificó un triptófano en el sitio de unión al ARNt cerca de la región RU5 en el 5'LTR, y la región clonada en el 3'LTR exhibía una potente actividad promotora, definiendo así una nueva familia de retrovirus endógenos que se llamó HERV-W<sup>[202]</sup>.

El gen *env* de tipo MSRV puede ser distinguido de la *sincitina-1* por la presencia de una inserción de 12 nucleótidos que codifican parte de la región transmembrana de Env MSRV<sup>[178, 203]</sup>, de tal manera que el ARN de ambos comparte una homología del 94%<sup>[180]</sup>, pero pueden ser distinguidos a través de la utilización de una RT-PCR diferencial<sup>[203]</sup>. Esta inserción puede describirse con alguna variación en todos los clones descritos de MSRV, pero no aparece en ninguna secuencia descrita perteneciente a la sincitina. Ambos genes se expresan en el

cerebro de pacientes con EM, pero mientras que las copias de ADN del tipo *env* MRSV se encontraron 6 veces más abundantes en pacientes que en controles, no se encontraron diferencias significativas entre las copias de *sincitina-1*<sup>[203]</sup>.

Desde que se descubriese, son muchos los estudios que han relacionado a esta familia de retrovirus con la EM: se ha descrito la presencia de la proteína Env de tipo MSRV en lesiones desmielinizantes agudas en estudios postmortem de pacientes con EM correlacionando con la extensión de la desmielinización activa y la inflamación<sup>[152]</sup>, así como una alta prevalencia de secuencias de ARN de tipo MSRV o del número de copias de ADN de tipo MRSV en el suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de pacientes con EM comparado con pacientes de otras enfermedades neurológicas o controles en todos los grupos étnicos<sup>[152, 169-174]</sup>. Además, se encontró una mayor expresión de epítomos Env de HERV-W y de HERV-H, en células B y en monocitos de pacientes con EM activa comparado con pacientes con EM estable o con controles, y estos pacientes con EM activa tenían un mayor número de células B y mayor reactividad de anticuerpos frente a los epítomos de Env HERV-H/W<sup>[145]</sup>.

Además de la expresión diferencial observada en enfermos frente a controles, diversos estudios muestran que la presencia de MSRV correlaciona con la progresión clínica, severidad y pronóstico de la enfermedad. Así pues, la presencia de MSRV en LCR se asocia con un curso más desfavorable de la enfermedad, con un mayor ratio de recaídas y una mayor acumulación de la discapacidad, mientras que su ausencia está relacionada con un curso más estable de la enfermedad<sup>[170, 185]</sup>. La producción de MRSV es estimulada por citoquinas como TNF $\alpha$ , IL6 e IFN $\gamma$ <sup>[204]</sup>, mientras que tratamientos actuales de la EM, como son el IFN $\beta$  y el Natalizumab, además de frenar la progresión de la enfermedad (o reducir la sintomatología) provocan una reducción en los niveles de carga viral de tipo MSRV en sangre<sup>[187, 188, 204]</sup>, por lo que podría ser considerado como un posible biomarcador<sup>[187, 188, 204, 205]</sup>.

En lo referente a modelos animales de EM, Perron y su equipo<sup>[206]</sup> observaron que la sustitución del lisado de *Mycobacterium tuberculosis* por la proteína Env del tipo MSRV conducía también al desarrollo de la sintomatología propia del modelo típico de EAE observado al utilizar CFA, postulando que la proteína Env de tipo MSRV podría tratarse del vínculo entre varios co-factores desencadenantes (por ejemplo infecciones con un herpesvirus) y la cascada inmunopatogénica conducente a enfermedades neuroinflamatorias como la EM<sup>[206]</sup>.

La variante patogénica Env del tipo MSRV podría originarse a partir de cualquier inserción del retrovirus presente en el genoma humano, o de recombinaciones entre *loci* de distintos cromosomas<sup>[207, 208]</sup>. El clon de *env* MSRV, AF331500, corresponde al elemento *env* de tipo MSRV localizado en el CrX, que alberga una ORF para una proteína de 475aa<sup>[208]</sup>. Se trata de la copia más completa, que codifica para una proteína Env de tipo MSRV casi completa, interrumpida por una mutación de codon stop<sup>[116]</sup>. La eliminación de ese codon stop en la posición 39 de *env* HERV-W en Xq22.3, resultaría en una proteína completa con un péptido

señal<sup>[208]</sup>. Esto no permite descartar una reactivación de la expresión de ARN codificante para una proteína truncada Env que conserve el sitio inmunopatogénico activo interactuando con el receptor de TLR4 en células inmunes, provocando un efecto pro-inflamatorio<sup>[116, 207]</sup>. Dilucidar el origen del MSRV y profundizar más en el conocimiento de dicho elemento, que aparentemente parece jugar un papel importante en la etiopatogenia de la enfermedad según todos los estudios realizados hasta la fecha, abre una posibilidad al desarrollo de nuevas terapias y formas de diagnóstico o de pronóstico del desarrollo de la misma.

### *Mecanismos inmunopatogénicos de MSRV*

Las proteínas Env de la familia HERV-W, Env de tipo MSRV y Sincitina, poseen propiedades pro-inflamatorias y superantigénicas, pudiendo causar neuroinflamación, neurodegeneración, alteraciones del sistema inmune y respuestas de estrés del retículo endoplásmico<sup>[177]</sup>. Se ha estudiado su patogenicidad *in vitro* utilizando distintos cultivos celulares, e *in vivo* utilizando un modelo animal de inmunodeficiencia combinada severa (SCID) humanizado, mostrando efectos neurotóxicos en ambos casos<sup>[178, 209]</sup> a la vez que reduce la capacidad de diferenciación de las células progenitoras de oligodendrocitos interfiriendo en el proceso de remielinización<sup>[160]</sup>. La unidad de superficie (SU) de la proteína Env de MSRV contiene el sitio de unión a receptores celulares, y es la responsable de interaccionar de manera natural con las células hospedadoras.

Podemos clasificar los mecanismos patogénicos de Env en dos grupos según los efectos provocados. En primer lugar posee propiedades proinflamatorias, actuando tanto como un superantígeno y activando a los linfocitos T, como a través de su interacción con el TLR4 y la activación de CPAs. Y por otro lado, también es capaz de interferir en el proceso de remielinización disminuyendo la capacidad de diferenciación de las células progenitoras de oligodendrocitos (CPO) vía estrés nitrosativo. De tal forma que la proteína Env de HERV-W no solo actuaría como un componente inmunopatológico de la EM, sino que también podría tener un impacto negativo en la reparación endógena de la mielina.

A continuación se detallan dichos mecanismos patogénicos (Fig. 10):

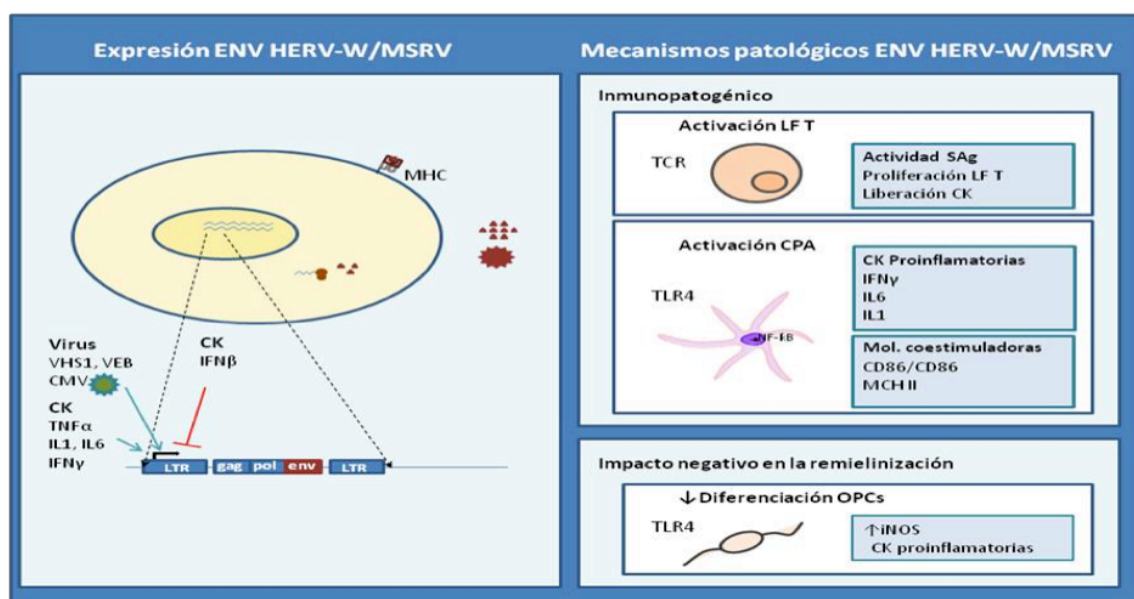
#### a) Actividad proinflamatoria:

1. Actividad superantígeno: La proteína Env puede provocar una respuesta inmune anormal a través de la activación policlonal de linfocitos T V $\beta$ 16<sup>[210]</sup>. El potencial inmunopatogénico de estas partículas y su capacidad para inducir citoquinas proinflamatorias mediada por los linfocitos T se ha confirmado *in vivo* a través de un modelo animal de ratones SCID humanizados<sup>[209]</sup>.



2. Activación del TLR4: Env-SU presente en la cápside de las partículas retrovirales, es reconocida por el TLR4 unido a la molécula accesoria MD2 de las CPAs, activa la transcripción de NF- $\kappa$ B en el núcleo, y resulta en la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$  e IL6) que interfieren en la respuesta innata, y en la producción de TNF $\alpha$  que estimula la migración de las células dendríticas<sup>[161]</sup>. A través de la producción de grandes cantidades de IL6, Env podría interferir con la actividad supresora de las células Treg, y la activación linfocitaria de células T autorreactivas<sup>[161]</sup>. La producción de citoquinas proinflamatorias va también acompañada de un aumento en la expresión de células coestimuladoras, CD80, CD86 y MHCII en la superficie celular; y se ha descrito que podría activar a las células dendríticas promoviendo el desarrollo de respuestas del tipo Th1<sup>[161]</sup>. Las células dendríticas no expresan receptor CD14 en su superficie, pero se piensa que su capacidad para responder frente a Env del tipo MSRV recae en el reclutamiento de CD14 soluble presente en suero<sup>[161]</sup>. Estos efectos proinflamatorios se han estudiado en pacientes que padecen EM y se han comparado con individuos sanos, observando que la producción de IL6 inducida por Env-SU estaba aumentada en EM y correlaciona con su estado clínico (EDSS)<sup>[183]</sup>.

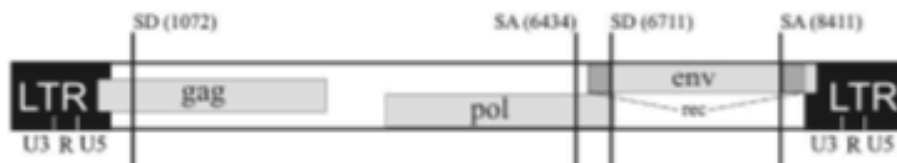
b) Inhibición de la diferenciación de CPOs vía stress nitrosativo: Las CPOs de humanos y de ratas expresan TLR4, y su activación mediante Env permite la inducción de proteínas proinflamatorias y óxido nítrico sintasa inducible, así como la formación de grupos nitrotirosina y la subsecuente reducción en la expresión de la proteína de la mielina<sup>[160]</sup>. Se ha descrito la presencia de Env próxima a los TLR4 expresados por CPOs que se encontraban adyacentes a las lesiones de EM. Esto provocaría una disminución en su capacidad de diferenciación hacia oligodendrocitos, y por tanto, un fallo en la remielinización.



**Figura 10.** Figura que ilustra los principales mecanismos de expresión y patogénicos relacionados con MSRV.

### 3.5.2 HERV-K

HERV-K es una familia multicopia con alrededor de 332 copias descritas en el genoma humano. Se trata del único elemento retroviral conocido que codifica para todas las proteínas estructurales y enzimáticas (Gag, Prt, Pol), así como para la proteína de la envuelta y una proteína accesoria Rec con funcionalidad similar a la proteína Rev del HIV<sup>[211]</sup> (Fig. 11). Dichos genes se encuentran flanqueados en sus extremos 3' y 5' por LTRs. Junto con la estructura prototipo de HERV-K, existe un segundo tipo de provirus HERV-K, caracterizado por la fusión de los genes *pol* y *env* debido a una delección de 292bp y la pérdida del gen *rec*.



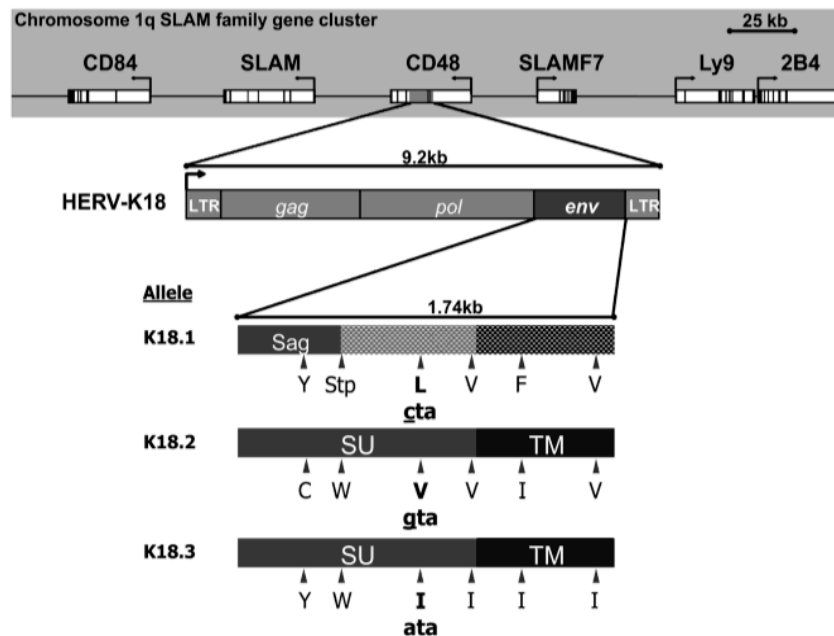
**Figura 11.** Estructura y organización HERV-K. Modificada de Kessler et al, 2014

Se han venido observando transcritos de HERV-K en multitud de cánceres humanos, como en el caso de teratocarcinomas<sup>[129]</sup>, melanomas<sup>[127]</sup>, o cáncer de ovario<sup>[130]</sup> <sup>[128]</sup>. Además, también se han detectado anticuerpos frente a los transcritos de *env* y *gag* de HERV-K en el suero de pacientes con melanoma o cáncer de útero, por lo que se ha discutido que estos antígenos presentes en la superficie de células cancerosas podrían ser dianas potenciales para una terapia inmune frente al cáncer<sup>[212]</sup>.

### HERV-K18 y EM

Nuestro estudio se ha centrado específicamente en la copia llamada HERV-K18, una inserción de 9235pb localizada en el Cr1q23.1-q24, en el primer intrón del gen *CD48*<sup>[138, 213]</sup>. Existen 3 variantes genéticas distintas del gen *env* basadas en tres haplotipos distintos (K18.1-3). El haplotipo HERV-K18.1 presenta un aminoácido Cisteína en la posición 97 y un codon stop en la posición 154; HERV-K18.2 presenta una Tirosina en la posición 97 y no posee codon stop en la posición 154, por lo que da lugar a una proteína completa; y HERV-K18.3 presenta un aminoácido Cisteína en la posición 97 y no posee codon stop en la posición 154, por lo que también da lugar a una proteína completa (Fig. 12). Las tres variantes dan lugar a tres isoformas distintas de Env HERV-K18 que actúan como un superantígeno estimulando a las células T<sup>[138]</sup>. La inducción de un superantígeno podría perturbar la regulación inmune activando células T autorreactivas, correlacionando con una de las hipótesis propuestas en relación al desarrollo de la EM. Haplotipos del gen *env* de este retrovirus se han visto

asociados a enfermedades de origen autoinmune como son la esclerosis múltiple<sup>[138]</sup>, la diabetes tipo 1<sup>[186]</sup> o la artritis juvenil<sup>[134]</sup>. A través del genotipado de HERV-K18 en pacientes de EM y controles, se ha observado que el haplotipo HERV-K18.3 se encuentra incrementado en los pacientes frente a los controles, por lo que representaría un factor de riesgo al desarrollo de EM<sup>[138]</sup>.



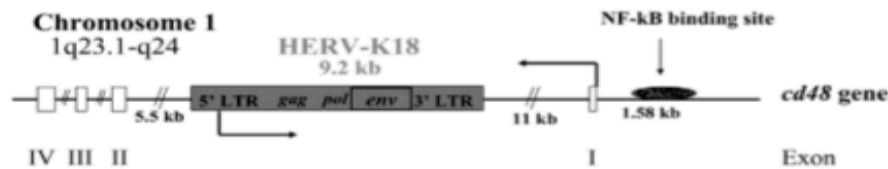
**Figura 12.** Estructura y localización HERV-K18 inserto en el Cr1 en el intrón 1 del gen CD48, y sus tres posibles haplotipos Tai et al, 2008.

### *Posibles mecanismos de expresión de HERV-K18*

La expresión de dicho superantígeno se ha visto relacionada con virus como el HHV-6<sup>[214, 215]</sup> y el VEB<sup>[213, 216]</sup>, ambos relacionados previamente con la EM<sup>[217-219]</sup>, así como con el tratamiento con IFN de tipo I exógeno.

Se ha descrito que la infección por VEB puede inducir un superantígeno que activa predominantemente células T que llevan el receptor Vβ13. Sin embargo, este superantígeno no está codificado por el propio genoma del VEB, sino que está inducido por transactivación del gen *env* de HERV-K18. Son varios los estudios que muestran que dicho herpesvirus linfotrópico activa transcripcionalmente el gen *env* del retrovirus endógeno HERV-K18 en los linfocitos B<sup>[213, 216, 220, 221]</sup>, comprobándose que puede ser inducido en un curso temprano de la infección, antes de establecerse una latencia del VEB, e incluso en linfocitos B en reposo<sup>[213]</sup>. Se ha descrito un sitio putativo de unión de NF-KB situado aproximadamente a 1.58kb del sitio de iniciación del gen *cd48*<sup>[222]</sup> (Fig. 12). Este elemento podría mediar la inducción de Env

HERV-K18 por la proteína latente de membrana del VEB (LMP)-2A y su receptor celular CD21, a través de su motivo inmuno-receptor de activación basado en tirosinas (ITAM)<sup>[213, 216]</sup>. Este motivo ITAM contiene dos citosinas que inician la cascada de reconocimiento cuando ambos residuos están fosforilados<sup>[213]</sup>. Así pues, tanto el sitio de unión de NF-KB como el LTR HERV-K18 son dos candidatos potenciales para la inducción del superantígeno HERV-K18.



**Figura 12.** Figura que muestra el sitio putativo de unión de NF-KB, situado aproximadamente a 1.58kb del sitio de iniciación de *cd48*. Hsiao, 2009

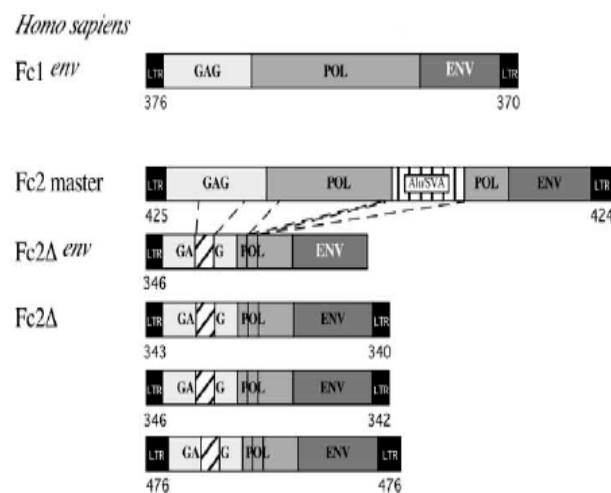
El herpesvirus HHV-6A, un virus neurotrópico asociado con EM, es el segundo elemento infeccioso relacionado con un aumento de la expresión del superantígeno codificado por HERV-K18<sup>[215]</sup>. Existen dos variantes de HHV6, A y B, siendo la variante A más neurotrópica que B. El estudio de Tai et al<sup>[215]</sup> muestra que HHV-6A, tanto en forma latente como durante infección aguda, transactiva HERV-K18. Esta inducción de HERV-K18 podría ser mediada por IFN-alfa, ya que se ha demostrado que es un potente inductor de la transcripción de HERV-K18, y se sabe que es producido por células infectadas por HHV-6A tanto de forma activa como de forma latente. En cuanto a la otra variante de HHV-6, HHV-6B, también se ha observado que la expresión de HERV-K18 Env está sobre regulada en PBMCs infectadas con HHV-6B, aunque los niveles más altos de ARNm de HERV-K18 Env inducidos por HHV-6B se observaron en monocitos<sup>[214]</sup>. Ya que HHV-6B puede infectar varios tipos celulares abortivamente, podría inducir la expresión de HERV-K18 Env en muchos tipos celulares distintos, incluyendo CPAs en el cerebro. La inducción del superantígeno por el virus podría tratarse del mecanismo subyacente a la asociación de HHV-6B con varias enfermedades del sistema nervioso central.

### 3.5.3 HERV-Fc1

HERV-Fc1 forma parte de la familia HERV-H/F, identificada por un gen *env* codificante para una proteína completa Env en primates. Se han identificado un total de 6 elementos HERV-Fc y 11LTRs formando parte del genoma humano, que pueden ser clasificados en dos subgrupos distintos (Fc1 y Fc2)<sup>[223]</sup>. De entre ellos, únicamente 2 corresponden a provirus completos HERV-Fc (Fc1env y Fc2master), mientras que los otros 4 corresponden a elementos truncados con reordenamientos compartidos (más parecidos a Fc2)<sup>[223]</sup> (Fig. 13). Podría decirse que el elemento llamado HERV-Fc1 es un provirus inusual, puesto que se compone de una única

integración conocida en el genoma. Dicha integración está localizada en Xq21.33, con una longitud de 7944pb, y se trata de una adquisición genómica reciente, solo presente en humanos, chimpancés y gorilas<sup>[223]</sup>. Posee los genes *gag* y *pol* casi completos, mientras que los genes *pro* y *env* se encuentran intactos<sup>[181]</sup>, todos ellos flanqueados por dos LTR y con un sitio PBS potencial para un ARNt fenilalanina justo después del 5'LTR.

En cuanto a su expresión, se han detectado transcritos del gen HERV-Fc1 *env* en diferentes tejidos humanos incluyendo testículos, piel y tráquea, indicando que su promotor está activo<sup>[224]</sup>. No está claro si HERV-Fc1 es infeccioso, sin embargo, los análisis del ADN proviral sugieren que el ORF de *gag* termina con dos codones stop, comparado con el codon stop único en retrovirus exógenos; mientras que el ORF de *pol* está interrumpido por una mutación de pérdida de marco de lectura y por un codon stop prematuro, por lo que la idea de que formase una partícula viral funcional debería ser considerada de forma hipotética<sup>[181]</sup>. Sin embargo, no se puede excluir la contribución de otros virus endógenos a una infectividad putativa a través de la recombinación. Podría ser que el determinante relevante de infectividad en el organismo no sea el locus individual sino el repertorio de secuencias provirales<sup>[139]</sup>.



**Figura 13.** Miembros de la familia de HERV-Fc, divididos en 2 subgrupos. Sólo 2 poseen la secuencia codificante para el gen *envelope* completa. L.Bénit et al., 2003

### HERV-Fc1 y EM

El locus de integración de HERV-Fc1 ha sido relacionado previamente con la susceptibilidad a padecer EM. Nexø et al.<sup>[139]</sup> fueron los primeros en describir que un SNP (rs391745) localizado en la región promotora de HERV-Fc1 se encontraba asociado con la susceptibilidad al

desarrollo de la enfermedad en cohortes danesas, y posteriormente se realizó una replicación en una cohorte noruega<sup>[140]</sup> que puntualizó que la asociación se observaba únicamente con las formas no PP de la enfermedad.

Los estudios de expresión de HERV-Fc1 muestran que los niveles de ARN HERV-Fc1 están significativamente incrementados en plasma de enfermos con EM activa frente a controles o enfermos con EM no activa<sup>[181]</sup>. Estos datos, obtenidos por ensayos qPCR, muestran que las secuencias de ARN tipo HERV-Fc1 se expresan y se liberan más por células de pacientes con la enfermedad activa, y que el gen *gag* de HERV-Fc1 es, al menos, parcialmente transcrito<sup>[181]</sup>. La asociación puede reflejar el aumento de actividad celular observado durante los periodos de activación de la enfermedad, pudiendo aumentar la activación y quizás la replicación de HERV-Fc1, y por tanto, tratarse de un marcador de la actividad de la enfermedad en EM<sup>[181]</sup>.

#### *Posibles mecanismos de expresión HERV-Fc1*

Se ha observado que los niveles de expresión transcripcional de las secuencias de ARN procedente de HERV-Fc1 correlacionan negativamente con los niveles de metilación de las islas CpG en la región LTR 5'<sup>[225]</sup>. Apoyando este hecho, se ha observado que el tratamiento con el agente desmetilante 5-aza-2'deoxicitina (5-aza-dC), resulta en niveles de expresión significativamente incrementados de transcritos relacionados con secuencias ARN *gag* o *env* de HERV-Fc1 en células que previamente o no expresaban HERV-Fc1, o que lo expresaban con niveles muy bajos<sup>[225, 226]</sup>. Esto refleja presumiblemente una desmetilación localizada en el sitio de inicio de la transcripción de dichas secuencias de ADN inducida por la exposición a 5-aza-dC<sup>[225]</sup>. Aunque los niveles de metilación observados en la región 5'LTR-*gag* de HERV-Fc1 varían según las líneas celulares, en todas ellas sobrepasa el 95%<sup>[225]</sup>. Además, no parece que HERV-Fc1 sea capaz de desmetilar su provirus en condiciones fisiológicas, sino que la pérdida de metilación debe ser el resultado de cambios genéticos en la célula, por ejemplo, por una pérdida en la actividad de DNMT1<sup>[225]</sup>. Por tanto, la desmetilación parece necesaria para una expresión incrementada de HERV-Fc1<sup>[225, 226]</sup>.

## OBJETIVOS

Los objetivos del presente estudio son:

- Dilucidar el origen cromosómico de las partículas virales de tipo MSRV, a través del estudio genómico de las copias de HERV-W más conservadas, situadas en el CrX y Cr20.
- Realizar en nuestra población el genotipado de los haplotipos de HERV-K18 previamente descritos en la literatura, mediante amplificación específica de la región y el uso de sondas TaqMan, y llevar a cabo un meta-análisis con los datos previamente publicados para valorar el efecto promedio del haplotipo de riesgo descrito en distintas enfermedades autoinmunes.
- Realizar el genotipado de HERV-Fc1 (rs391745) en nuestra cohorte mediante sondas TaqMan incorporando dos cohortes adicionales al estudio, provenientes del Norte y del Sur de España, y llevar a cabo un meta-análisis con los datos previamente publicados con el objetivo de valorar el efecto del SNP descrito en relación a la EM.
- Estudiar el posible efecto de los alelos HLA de clase I y II en relación con la susceptibilidad al desarrollo de reacciones de hipersensibilidad frente al Natalizumab.
- Estudiar el inhibidor del transportador nuclear CRM1, KPT350, como posible tratamiento frente al daño axonal observado en las enfermedades desmielinizantes.





## TRABAJOS

1. *HERV-W polymorphism in chromosome X is associated with multiple sclerosis risk and with differential expression of MSR.V.* García-Montojo M, de la Hera B, Varadé J, de la Encarnación A, Camacho I, Domínguez-Mozo M, Árias-Leal A, García-Martínez A, Casanova I, Izquierdo G, Lucas M, Fedetz M, Alcina A, Arroyo R, Matesanz F, Urcelay E, Alvarez-Lafuente R. *Retrovirology*. 2014 Jan 9;11:2.
2. *Multiple sclerosis retrovirus-like envelope gene: Role of the chromosome 20 insertion.* Varadé J, García-Montojo M, de la Hera B, Camacho I, García-Martínez A, Arroyo R, Álvarez-Lafuente R, Urcelay E. *BBA Clinical*. 2015 Feb;(3):162-167.
3. *Role of the human endogenous retrovirus HERV-K18 in autoimmune disease susceptibility: study in the Spanish population and meta-analysis.* de la Hera B, Varadé J, García-Montojo M, Lamas JR, de la Encarnación A, Arroyo R, Fernández-Gutiérrez B, Alvarez-Lafuente R, Urcelay E. *PLoS One*. 2013 Apr 25;8(4):e62090.
4. *Human endogenous retrovirus HERV-Fc1 association with multiple sclerosis susceptibility: a meta-analysis.* de la Hera B, Varadé J, García-Montojo M, Alcina A, Fedetz M, Alloza I, Astobiza I, Leyva L, Fernández O, Izquierdo G, Antigüedad A, Arroyo R, Álvarez-Lafuente R, Vandenbroeck K, Matesanz F, Urcelay E. *PLoS One*. 2014 Mar 3;9(3):e90182
5. *Natalizumab-related anaphylactoid reactions in MS patients are associated with HLA class II alleles.* de la Hera B, Urcelay E, Brassat D, Chan A, Vidal-Jordana A, Salmen A, Villar LM, Alvarez-Cermeño JC, Izquierdo G, Fernández O, Oliver B, Saiz A, Ara JR, Vigo AG, Arroyo R, Meca V, Malhotra S, Fissolo N, Horga A, Montalban X, Comabella M. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*. 2014 Dec 11;1(4):e47
6. *Nuclear export inhibitors avert progression in preclinical models of inflammatory demyelination.* Haines JD, Herbin O, de la Hera B, Vidaurre OG, Moy GA, Sun Q, Fung HY, Albrecht S, Alexandropoulos K, McCauley D, Chook YM, Kuhlmann T, Kidd GJ, Shacham S, Casaccia P. *Nat Neurosci*. 2015 Apr;18(4):511-20.





RESEARCH

Open Access

# HERV-W polymorphism in chromosome X is associated with multiple sclerosis risk and with differential expression of MSRV

Marta García-Montojo<sup>1\*†</sup>, Belén de la Hera<sup>2†</sup>, Jezabel Varadé<sup>2†</sup>, Ana de la Encarnación<sup>2</sup>, Iris Camacho<sup>2</sup>, María Domínguez-Mozo<sup>1</sup>, Ana Arias-Leal<sup>1</sup>, Ángel García-Martínez<sup>2</sup>, Ignacio Casanova<sup>1</sup>, Guillermo Izquierdo<sup>3</sup>, Miguel Lucas<sup>4</sup>, María Fedetz<sup>5</sup>, Antonio Alcina<sup>5</sup>, Rafael Arroyo<sup>1</sup>, Fuencisla Matesanz<sup>5</sup>, Elena Urcelay<sup>2†</sup> and Roberto Alvarez-Lafuente<sup>2†</sup>

## Abstract

**Background:** Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune demyelinating disease that occurs more frequently in women than in men. Multiple Sclerosis Associated Retrovirus (MSRV) is a member of HERV-W, a multicopy human endogenous retroviral family repeatedly implicated in MS pathogenesis. MSRV envelope protein is elevated in the serum of MS patients and induces inflammation and demyelination but, in spite of this pathogenic potential, its exact genomic origin and mechanism of generation are unknown. A possible link between the HERV-W copy on chromosome Xq22.3, that contains an almost complete *open reading frame*, and the gender differential prevalence in MS has been suggested.

**Results:** MSRV transcription levels were higher in MS patients than in controls (U-Mann–Whitney;  $p = 0.004$ ). Also, they were associated with the clinical forms (Spearman;  $p = 0.0003$ ) and with the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) (Spearman;  $p = 0.016$ ). By mapping a 3 kb region in Xq22.3, including the HERV-W locus, we identified three polymorphisms: rs6622139 (T/C), rs6622140 (G/A) and rs1290413 (G/A). After genotyping 3127 individuals (1669 patients and 1458 controls) from two different Spanish cohorts, we found that in women rs6622139 T/C was associated with MS susceptibility: [ $\chi^2$ ;  $p = 0.004$ ; OR (95% CI) = 0.50 (0.31–0.81)] and severity, since CC women presented lower MSSS scores than CT (U-Mann–Whitney;  $p = 0.039$ ) or TT patients (U-Mann–Whitney;  $p = 0.031$ ). Concordantly with the susceptibility conferred in women, rs6622139\*T was associated with higher MSRV expression (U-Mann–Whitney;  $p = 0.003$ ).

**Conclusions:** Our present work supports the hypothesis of a direct involvement of HERV-W/MSRV in MS pathogenesis, identifying a genetic marker on chromosome X that could be one of the causes underlying the gender differences in MS.

**Keywords:** Multiple sclerosis, Human endogenous retrovirus, HERV-W, Multiple sclerosis associated retrovirus, Chromosome x, Sex, Gender differences, Autoimmunity

\* Correspondence: mgmontojo@salud.madrid.org

†Equal contributors

<sup>1</sup>Multiple Sclerosis Unit, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, Profesor Martín Lagos s/n., 28240, Madrid, Spain

Full list of author information is available at the end of the article



## Background

Human endogenous retroviruses (HERVs) are believed to be remnants of ancient exogenous infections. They entered the germ line during primate evolution and as retroviruses were able to replicate and retrotranspose, increasing their copy number and spreading all over the genome. Indeed, approximately an 8% of the genome has a retroviral origin [1]. During evolution, most of the HERV proviruses have undergone extensive mutations and are unable to replicate. Nowadays, they reside in the genome of all human cells and are transmitted in Mendelian fashion.

Retroviruses typically consist of an internal region containing *gag*, *pro*, *pol*, and *env* genes, flanked by two long terminal repeats (LTR). Some HERVs have retained open reading frames (ORFs) putatively encoding functional proteins. These proteins can display a physiological role, as Syncytin-1 which is involved in the formation of the syncytiotrophoblast during pregnancy [2]; but as viral products, they might show antigenic properties involving the immune system. Indeed, HERVs have been associated with several pathologies as cancer and autoimmune diseases. HERVs RNAs, proteins or virions have been found in different tumor tissues [3-7], in schizophrenia [8-10], rheumatoid arthritis [11] and especially in multiple sclerosis (MS) [12,13].

Mainly two HERV families have been related to MS: HERV-W and HERV-H; and among them, the member most intensively studied is MSRV, a HERV-W-related retroelement [14].

Depending on the cohort studied, the percentage of MS serum or plasma samples positive to MSRV ranges from 50% [15] to 100% [16]. Enhanced expression of MSRV was also detected in MS plaques in independent post-mortem brain studies [17-19] and increased MSRV copy number in MS blood DNA was associated with a poorer MS prognosis [20,21]. Besides, interferon-beta reduces MSRV load in MS patients with a good clinical response to the treatment [22], suggesting that it could be a biomarker to monitor disease progression and therapy outcome.

MSRV might be exerting its role in MS pathogenesis through the activation of innate immunity and subsequent release of pro-inflammatory cytokines [23] through Toll-like receptor (TLR-4) [24]. It acts as a superantigen producing polyclonal T-lymphocyte activation [25] and it triggers a T-cell mediated neuropathology *in vivo* [26].

In spite of its pathogenic potential, the exact genomic origin of MRSV is unknown. When MSRV was discovered, controversy arose regarding whether it was an endogenous or exogenous virus [14]; at present, it seems that MSRV is most likely transcribed from an HERV-W endogenous element [27]. The HERV-W family consists of approximately 650 elements dispersed through the

human genome [28], but the only member showing a full-length proviral copy with an ORF is the locus *ERVWE1* in the 7q21.2 chromosome, which encodes Syncytin-1 (Accession number: AF156963). *In silico* analyses have revealed that, in addition to the one previously described in chromosome 7, other putative complete retroviral units of HERV-W with *gag*, *pro*, *pol* and *env* might be replication competent [29]. Among all the *HERV-W* locations, the copy in chromosome Xq22.3 (*ERVWE2*) could be involved in MSRV expression due to several reasons. First of all, the *env* gene at this locus is the only known, besides *ERVWE1*, with an ORF only interrupted by a stop codon, and it has retained its coding capacity producing an almost complete N-truncated protein [30] *in vitro*. This sequence from chromosome X has important homologies with several reported MSRV clones derived from retrotranscription of RNA obtained from retroviral-like particles in MS patients. For example, the clone pV14 (AF331500) of MSRV *env* aligned with 98.5% of sequence identity and interestingly, the complete clone CL15 (AF127228) was 99.53% homologous to *env* + *pol* probably reflecting transcription of this region [27]. Moreover, a genetic origin in chromosome X could explain in part the higher prevalence of MS in women than in men (2:1 ratio).

In order to find polymorphisms associated with MS susceptibility that could be related with differential expression of MSRV in patients and controls, we mapped the *HERV-W* insertion in chromosome Xq22.3 and genotyped a total of 1669 patients and 1458 controls, from two different Spanish cohorts.

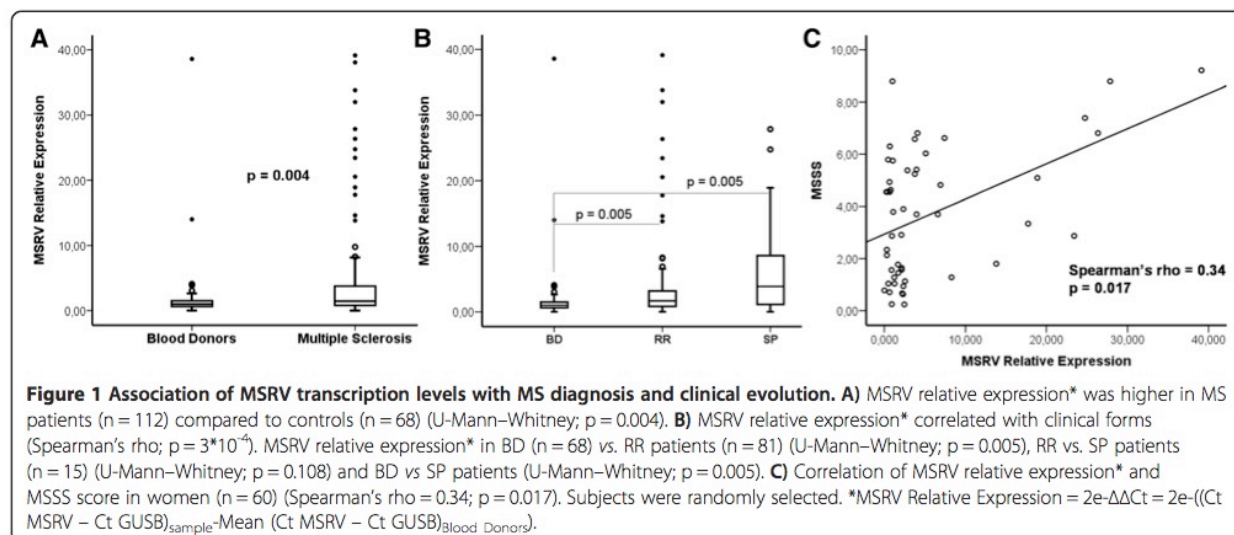
## Results

### Association of MSRV transcription levels with MS diagnosis and clinical evolution

To confirm the previously published association between MSRV RNA levels and MS, MSRV RNA expression was studied by RT-PCR in a randomly selected group of MS patients ( $n = 112$ ; 55.6% women) and controls ( $n = 68$ ; 53.3% women). The analysis was made with a set of primers and probe able to discriminate between syncytin-1 and MSRV *env* sequences [31]. MS patients presented higher MSRV RNA levels compared to controls (U-Mann-Whitney;  $p = 0.004$ ) (Figure 1A). Also, we found a correlation with the clinical forms (Spearman's  $\rho = 0.28$ ;  $p = 0.0003$ ) and lower levels of MSRV expression were found in blood donors (BD) than in relapsing-remitting (RR) MS patients (U-Mann-Whitney;  $p = 0.005$ ) or secondary-progressive (SP) patients (U-Mann-Whitney;  $p = 0.005$ ) (Figure 1B).

Regarding clinical parameters, a correlation between MSRV relative expression and Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) [32] (Spearman's  $\rho = 0.25$ ;  $p = 0.016$ ) was observed; also the number of relapses suffered in the





last two years tended to correlate with MSRV expression (Spearman's rho = 0.19; p = 0.06). When we stratified by sex, the correlation coefficient between the MSRV expression and MSSS increased in women (Spearman's rho = 0.34; p = 0.017) (Figure 1C), while only a trend could be seen in men (Spearman's rho = 0.22; p = 0.16).

#### Mapping of HERV-W copy in chromosome Xq22.3

First, we selected a region of 3 kb (106295193 – 106298196; Human GRCh37, March 2012) including the complete *HERV-W* locus. This sequence includes 3' portions of the *pol* gene, the complete *env* gene, and the U3 and R regions of the 3' LTR (Figure 2). Then, we amplified the sequence through 18 overlapping amplicons. Each PCR product was analyzed by High Resolution Melting (HRM) curve analysis in 100 individuals, detecting 5 different mutations: T/C at 445 nt, A/T at 464 nt, T/C at 1158 nt, G/A at 1943 nt and G/A at 2611 nt from the beginning of the amplicon. Besides, an insertion of a G nucleotide was found at 1778 nt. Only 3 of these variants were detected in more than 5% of the individuals: T/C at 1158 nt position (SNP1: rs6622139), G/A at 1943 nt (SNP2: rs6622140) and G/A at 2611 nt (SNP3: rs1290413). The analysis in Haploview 4.0 showed that rs6622139 and rs6622140 were in perfect linkage disequilibrium ( $r^2 = 1$ ) and both map in the *env* open reading frame; therefore, only rs6622139 and the third polymorphism, rs1290413, were further studied in our cohort.

#### Association of rs6622139 and rs1290413 with MS susceptibility

A total of 3127 individuals from two different Spanish cohorts were genotyped for rs6622139 and rs1290413: 893 MS patients and 664 controls from the discovery

cohort (Madrid) and 776 MS patients and 794 controls from the replication cohort (Andalusia). Clinical and demographic characteristics of patients and controls are described in Table 1.

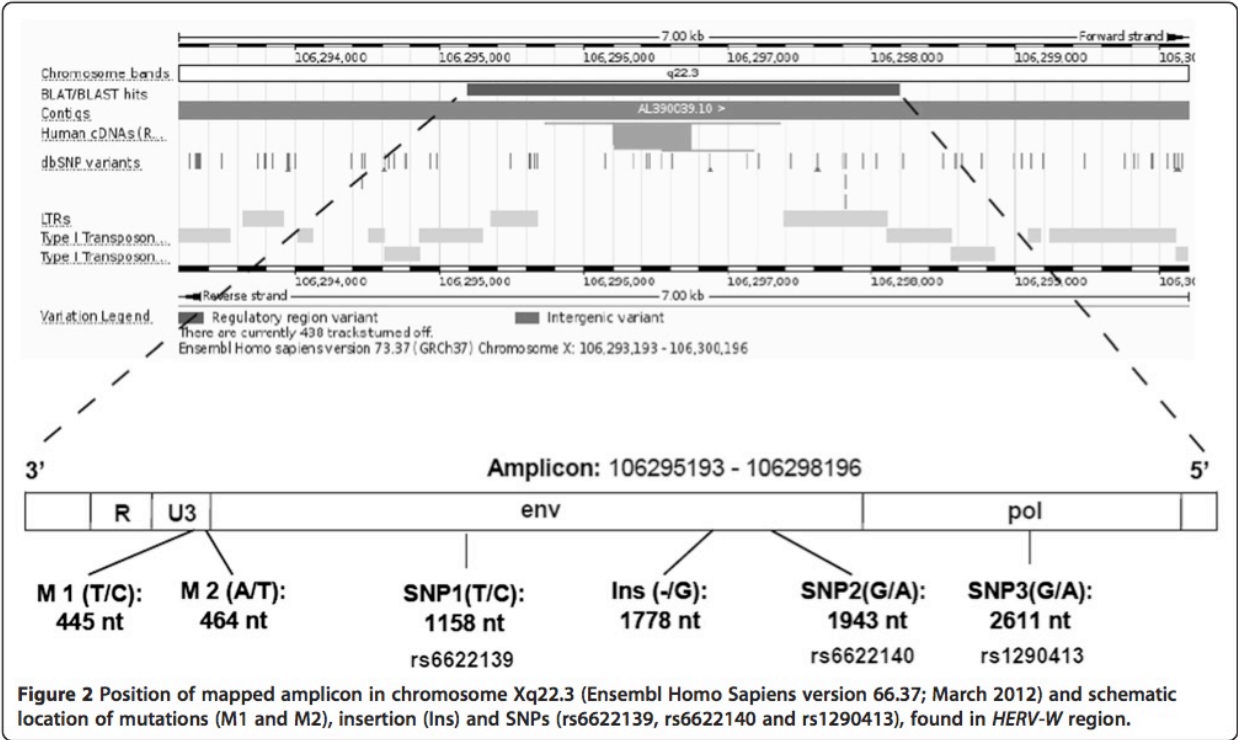
The SNPs were analyzed separately in both sexes due to their location in chromosome X. Genotyping success rate was over 98% for both markers. Genotype distribution of the SNPs in controls and MS patients and p-values are shown in Table 2.

In the discovery cohort significant associations of rs6622139 and rs1290413 with MS were found in women. The homozygous mutant genotype of rs6622139 showed a protective effect, being more frequent in control than MS women [p = 0.02; OR (95% CI) = 0.44 (0.20 – 0.96)] and the homozygous mutant genotype of rs1290413 also showed a nominal association with increased predisposition to MS in women [p = 0.05; OR (95% CI) = 1.81 (0.96-3.47)] (Table 2).

When data of a replication cohort were combined in order to increase the sample size and gain statistical power, the association of rs6622139\* C in homozygosis was corroborated [p = 0.004; OR (95% CI) = 0.50 (0.31-0.81)] (Table 2).

#### Association of rs6622139 with MS disability

As rs6622139 was associated with MS susceptibility in women, we analyzed its role in clinical evolution. MSSS score was available from most patients from the Madrid cohort, thus the analysis was made including these subjects. Among MS women, carriers of the homozygous mutant genotype for rs6622139 (CC) (n = 9) presented lower MSSS scores [32] than either CT (n = 118) (U-Mann-Whitney; p = 0.039) or TT (n = 245) (U-Mann-Whitney; p = 0.031) carriers (Figure 3).



**Association of rs6622139 with MSRV transcription levels**  
In agreement with the susceptibility conferred to women, rs6622139\*T allele was associated with higher levels of MSRV RNA than rs6622139\*C (U-Mann-Whitney;  $p = 0.003$ ) in the women with available data analyzed (Figure 4A). Moreover, a dose-effect was evidenced from the association of rs6622139 genotypes and MSRV transcription levels (U-Mann-Whitney; CC vs. CT:  $p = 0.033$  and CC vs. TT:  $p = 0.006$ ) (Figure 4B). However, since the number of individuals with GG

genotype in this group is very limited, any conclusion should be taken with caution.

**Discussion**  
In the present study we confirm increased levels of MSRV transcripts in MS patients compared to controls and correlation between MSRV expression and clinical severity (secondary progressive condition and MSSS) supporting the role of this element in MS pathology. Besides, we performed a genetic screening of the *HERV-W*

**Table 1 Clinical and demographic characteristics of studied individuals**

Characteristics	Discovery cohort		Replication cohort	
	Patients	Controls	Patients	Controls
Subjects (n)	893	664	776	794
Female (n (%))	593 (66.4)	371 (55.9)	539 (69.5)	513 (64.6)
Age (years) (Mean $\pm$ SD)	40.3 $\pm$ 9.5	41.2 $\pm$ 16.3	46.1 $\pm$ 11.4	40.2 $\pm$ 13.8
Age at onset (years) (Mean $\pm$ SD)	28.6 $\pm$ 8.1	-	30.8 $\pm$ 9.7	-
Clinical form:				
RR (n (%))	595 (66.6)	-	610 (78.6)	-
SP (n (%))	51 (5.7)	-	152 (19.6)	-
PP (n (%))	64 (9)	-	60 (7.7)	-
Disease duration (years) (Mean $\pm$ SD)	11 $\pm$ 6	-	13.2 $\pm$ 9.2	-
Current EDSS score (Mean $\pm$ SD)	3 $\pm$ 2	-	n.a*	-

\*Not available.



**Table 2 Genotype frequencies and statistical significance for rs6622139 and rs1290413 in Chr.X- HERV-W env copy**

rs6622139 (T → C)															
Females															
Center of Spain						South of Spain									
	MS		Controls		p-value	OR (95% C.I.)		MS		Controls		p-value	OR (95% C.I.)	p <sub>MH</sub>	OR (95% C.I.) <sub>MH</sub>
	n	%	n	%			n	%	n	%					
TT	413	70	245	66			353	65	338	66					
TC	167	28	108	29			170	32	148	29					
CC	13	2	18	5	0.02*	0.44 (0.20 -0.96)	16	3	27	5	0.06	0.55(0.28-1.08)	0.004**	0.50(0.31-0.81)	
Males															
Center of Spain						South of Spain									
	MS		Controls		p-value	OR (95% C.I.)		MS		Controls		p-value	OR (95% C.I.)	p <sub>MH</sub>	OR (95% C.I.) <sub>MH</sub>
	n	%	n	%			n	%	n	%					
T-	251	84	253	86	0.36	1.23 (0.77-1.99)	194	82	213	76	0.09	0.69(0.44-1.09)	-----	-----	
C-	49	16	40	14			43	18	68	24					
rs1290413 (G → A)															
Females															
Center of Spain						South of Spain									
	MS		Controls		p-value	OR (95% C.I.)		MS		Controls		p-value	OR (95% C.I.)	p <sub>MH</sub>	OR (95% C.I.) <sub>MH</sub>
	n	%	n	%			n	%	n	%					
GG	331	56	229	62			296	55	270	53					
GA	220	37	127	34			196	36	203	39					
AA	42	7	15	4	0.05*	1.81(0.96-3.47)	47	9	40	8	0.59	1.13(0.71-1.79)	0.10	1.34(0.94-1.91)	
Males															
Center of Spain						South of Spain									
	MS		Controls		p-value	OR (95% C.I.)		MS		Controls		p-value	OR (95% C.I.)	p <sub>MH</sub>	OR (95% C.I.) <sub>MH</sub>
	n	%	n	%			n	%	n	%					
G-	219	73	224	76	0.33	1.20(0.81-1.77)	173	73	208	74	0.79	1.05(0.70-1.59)	0.38	0.89(0.68-1.16)	
A-	81	27	69	24			64	27	73	26					

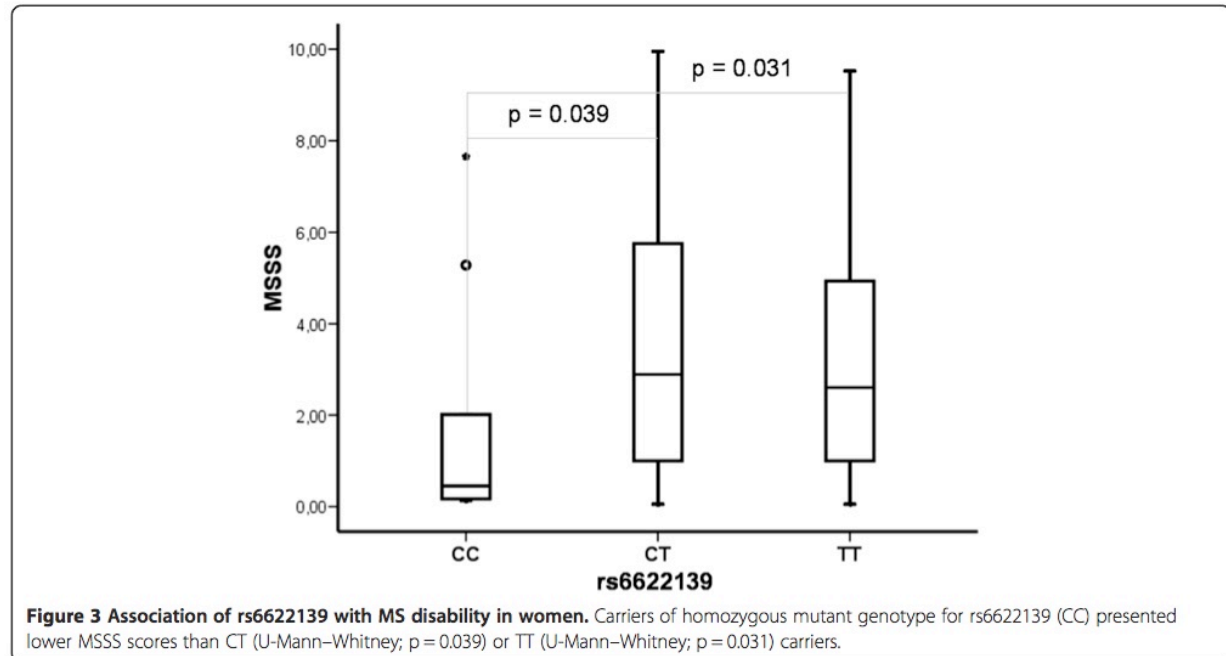
\*Statistically significant difference.

locus in chromosome Xq22.3, identifying a polymorphism that is associated with MS susceptibility and severity in women. Finally, we found significant differences between levels of MSRV expression comparing carriers of the rs6622139 genotypes. All these findings support the role of chromosome Xq22.3 HERV-W locus in MSRV expression and MS etiopathogenesis.

The polymorphism rs6622139 associated with the disease is in perfect linkage disequilibrium ( $r^2 = 1$ ) with rs6622140 and both map in the orf of the *env* sequence. Taking MSRV *env* sequence (AF33150) as reference, the locus *ERVWE2* studied here presents a stop codon at position 39; however, this locus harbours an orf with a start codon (ATG) at position 68 that encodes for a N-terminally truncated 475 amino acid Env protein [30]. The N-truncated protein is expressed intracellularly *ex vivo* [30], while MSRV *env*, as a full-length retroviral envelope protein, is expected to be expressed at the cell

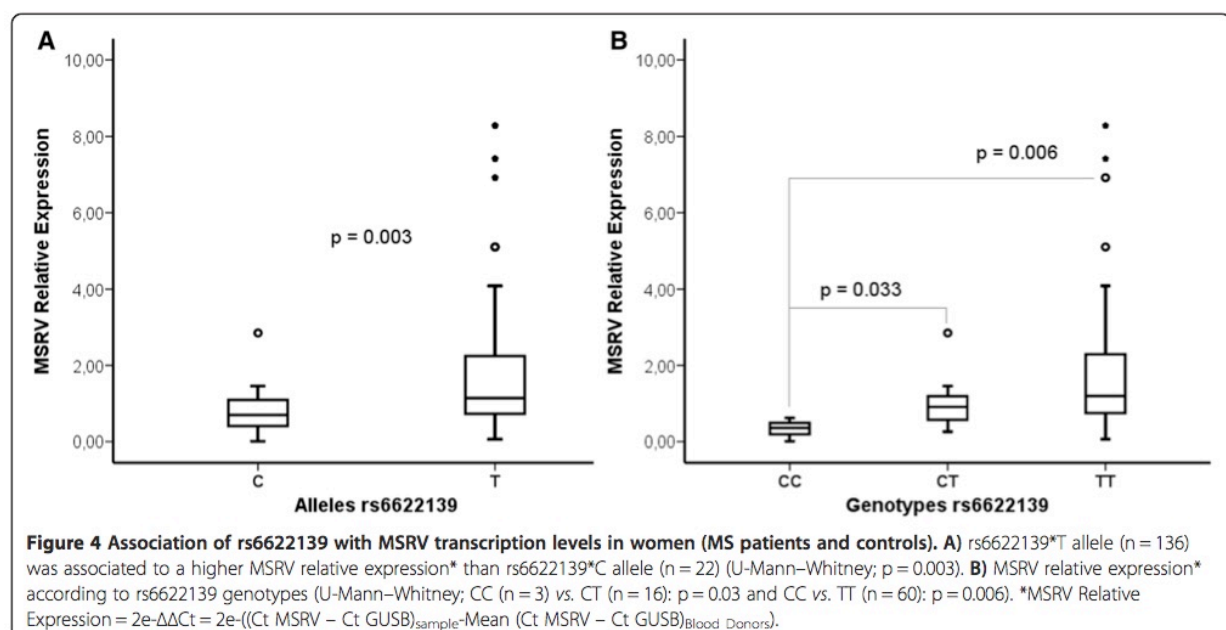
surface. When the stop codon was reverted *in vitro* the resulting protein was expressed on the cell surface. Given the fundamental changes provoked by the elimination of the stop codon in *ERVWE2*, it has been speculated that MSRV *env* sequences could come from *ERVWE2* variants lacking that stop codon [30]. After mapping *ERVWE2* we did not find any mutation reversing the stop codon in our Spanish cohort.

Another hypothesis to explain the origin of the reported MSRV *env* sequences is that they might derive from recombination of transcripts from various HERV-W loci [27]. Apart from the full-length MSRV *env*, it has been also suggested that the N-truncated protein encoded by *ERVW2* and other retroviral defective proteins may be expressed *in vivo* and exert functions in human physiology or pathology by themselves [30]. In fact, the primers used here and in other studies [31] that detect increased levels of HERV-W *env* (MSRV-type)



RNA transcripts in MS patients compared to controls, would detect both the full-length MSRV *env* and the N-truncated *env* sequence encoded by ERVWE2, since they hybridize at the common C-terminal region. The SNPs rs6622139 (C/T) and rs6622140 (G/A) map at the residues 10 and 272, respectively, of the N-truncated protein (position 38 and 299 from the stop codon) and

either the *env* protein is full-length or truncated, if ERVWE2 is involved in its origin, these polymorphisms would induce variations in its amino-acid sequence: rs6622139 (T/C) changes glycine by serine and rs6622140 (G/A) changes threonine by isoleucine. In both cases the substitution of an amino-acid with a hydroxyl (polar) group by an aliphatic one would be





observed. This could affect the tridimensional configuration of the putative protein making epitopes more or less accessible to the immune cells, and therefore could alter its antigenic properties. On the other hand, changes in the nucleotide sequence of the RNA might affect its stability and thereby influence RNA levels.

The mechanism of generation of MSRV is unknown, but interestingly, complex interactions between herpesviruses, which have been historically studied for their involvement in MS pathogenesis, and HERVs have been brought to light. *In vitro*, Epstein-Barr virus (EBV) activates HERV-W/MSRV/syncytin-1 in cells derived from blood and brain [33] and antigens from other herpesviruses as HSV-1, HHV-6, and VZV are able to induce higher RT activity in peripheral lymphocytes from MS patients compared to controls [34].

It is well-known that MS is more prevalent in women than in men. Indeed, the female to male ratio for MS incidence currently ranges from 2:1 to 3:1 and varies by region [35]. Notably, over the past six decades, this ratio seems to have increased [36]. Beyond that, gender seems to influence other aspects of MS as age at onset [37], "parent-of-origin" effect on susceptibility [38] and risk for relatives of MS patients [38]. Although usually women do not have a poorer prognosis, higher levels of inflammatory lesions measured by MRI have been shown in female MS patients [39] and peripheral immune responses are more robust in females [40].

The relationship of MSRV with the gender differences in MS has already been suggested [20]. The DNA copy number of HERV-W (MSRV-type) is higher in MS patients than in controls, but it is specially increased in MS women. Indeed, a possible origin of MSRV in chromosome X is supported by the fact that the MSRV proviral load is higher in females than in men, not only among MS patients but also among controls [20]. Moreover, MSSS scores were higher among female patients with an elevated MSRV DNA load [20].

To our knowledge, this is the first demonstration of the genetic association with MS risk of the HERV-W *env* insert in chromosome X. The association supports the etiopathogenic role of this locus in MS risk, adding on previously published evidence.

The X chromosome has been proposed to constitute the common trait of the susceptibility to autoimmune diseases, other than to explain the female preponderance of these conditions [41]. A disease-promoting effect conferred by genes in the X chromosome has been suggested in females (since some genes escape X inactivation, resulting in double dosage in females) [41]. The critical role played by products of single genes located on the X chromosome or X-linked microRNAs in autoimmunity is evidenced also by the fact that most X-linked primary immune deficiencies carry significant

autoimmune manifestations [41]. In this sense, the present data underline the crucial role of loci mapping to chromosome X in MS susceptibility.

## Conclusions

Our present work reinforces the hypothesis of a direct involvement of HERV-W/MSRV in MS pathogenesis, identifying a genetic marker on chromosome X that might contribute to the gender differences in MS. This sex-related difference could be exploited to develop novel therapeutic approaches for MS. Recently, the safety and pharmacokinetic profiles of GNBAC1, a humanized monoclonal antibody which is directed against MSRV-Env, have been evaluated and appeared favorable in healthy male volunteers [42]. In light of the present results, the next Phase II development program for this innovative therapeutic approach should include female patients as well, as an enhanced effect would be expected in them and would provide a genetic rationale for the gender bias observed in MS.

## Methods

### Patients and controls

A total of 1669 patients and 1458 controls from two different regions in Spain were included: from Madrid 893 MS patients (66.4% women) and 664 ethnically and age matched healthy controls (55.9% women) and from Andalusia 776 MS patients (69.5% women) and 794 controls (64.6% women); all of them had European ancestors. MS diagnosis was established according to McDonald's criteria [43]. All individuals participating in this study signed informed consent and the study was approved by the Ethics Committees of the respective hospitals.

None of the control subjects reported any first or second degree relatives with any immunological disease. Clinical and demographic characteristics are enclosed in Table 1.

### Sequence data source

Previously published MSRV-*env* sequence (GenBank: AF33150) was used to map the HERV-W *env* element located on the negative strand of human chromosome Xq22.3. This sequence was aligned with the BLAST tool available at ensemble (<http://www.ensembl.org>) and enlarged 1500 nt at both 3' and 5' ends.

### Primers design

Using PRIMER3 Input version (0.4.0) software (<http://frodo.wi.mit.edu/>), a pair of primers specific for the sequences adjacent to MSRV in chromosome X as well as 18 pairs of primers to perform High Resolution Melting curve analysis (HRM) [44] in overlapping amplicons (Additional file 1: Table S1) were designed.



### PCR amplification of the HERV-W region at Xq22.3

The selected amplicon of 3004 bp (106295193 – 106298196; Human GRCh37, March 2012) including *HERV-W* locus in chromosome Xq22.3 was amplified by PCR using the above mentioned specific pair of primers (Additional file 1: Table S1). PCR reaction was performed on 40 ng of genomic DNA (35 cycles: 94°C for 30s, 66°C for 30 s and 68°C for 180 s) in a final volume of 10ul of reaction mix containing the primers (0.4 uM), dNTPs (250uM), MgCl<sub>2</sub> (2.5 mM) and 0.8 units of enzyme (BIO-X-ACT™ Long polymerase, Bioline). The amplification of the expected 3Kb fragment was confirmed by electrophoresis in 0.8% agarose gel.

### High Resolution Melting curve analysis (HRM)

The PCR product of the specific Chr. X region diluted 1/80 on sterile water was used as template to perform HRM curve analysis on a 7900 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), according to manufacturer's recommendations. Over 1800 melting curves from 18 different amplicons were analyzed in 100 DNA samples (50 MS patients and 50 healthy controls).

### Sequencing analysis

At least three DNA samples from each group with altered melting curves compared with the average curve of wild-type subjects were sequenced. When a potential mutation or single nucleotide polymorphism (SNP) was detected, samples with the same melting curve were sequenced with BigDye Cycle sequencing kit (Applied Biosystems). Before sequencing, each HMR product was diluted 1/20 on sterile water.

### SNPs analysis

The newly described SNPs were analyzed by TaqMan assays by design, from Applied Biosystems in an ABI 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems), following the manufacturer's recommendations. The genotyping success rate was higher than 98%.

### MSRV expression analysis

Expression of MSRV was measured by quantitative real time RT-PCR with the relative method [45] which needs normalization with a housekeeping (HKG) gene. Before selecting Glucuronidase-B (*GUS-B*) as HKG gene, we analyzed the stability of its expression among MS patients and controls. The comparison of *GUS-B* Cts of both groups did not show significant differences (ANOVA,  $p = 0.98$ ). Besides, efficiencies of both assays (*MSRV* and *GUS-B*) were tested by performing standard curves with serial dilutions of cDNA after retrotranscription of total human RNA treated with DNase (Applied Biosystems); the efficiencies were 0.92 for *GUS-B* assay and 0.98 for *MSRV* assay.

RT positive controls and PCR controls were produced with the same batch of human total RNA (Applied Biosystems) as follows: part of the RNA diluted at 10 ng/ul was retrotranscribed into cDNA and then aliquoted to be used as "PCR control"; the rest of RNA was aliquoted to be used as "RT positive control" in each round of retrotranscription of our study. The cDNA was tested several times by real time PCR for *MSRV* and *GUS-B* and the means of the Cts were calculated. These values were used as references for the *MSRV* and *GUS-B* Cts of the "PCR controls" and the "RT positive controls" of each assay, since the same quantity of RNA was used in both cases. In case of failure, these two controls allowed us to detect at which step of the RT-PCR the problem occurred, i.e. if the retrotranscription step did not work correctly but the PCR did, the Ct of the PCR control would be similar to the reference value, but the Ct of the "RT positive control" would differ from them; on the contrary, if a problem occurred in the PCR step, both controls would differ from the reference value. PCR runs were accepted when both controls did not differ from the reference value more than 2% on Ct basis. This level of variation was used also to validate the duplicates of a sample [46].

From a group of randomly selected MS patients and blood donors RNA was extracted from PBMCs (Qiamp RNA Blood Mini kit, Qiagen) obtained by centrifugation of whole blood on CPT tubes (Becton Dickinson). The quality and concentration of RNA treated with DNase (Applied Biosystems) were assessed by spectrophotometer. Then, sample volumes were adjusted to 10 ng/ul followed by two-step RT-PCR. Briefly, RNA was retrotranscribed with the First Strand cDNA Synthesis kit (Roche Diagnostics) with Oligo dT primers. In each round of retrotranscription, a positive control consisting of human total RNA with a known *MSRV* level of expression (RT positive control) and a "no RT" control of each sample, consisting of the same reaction mix without retrotranscriptase, were added. Then, a quantitative real time PCR was performed on the cDNA with a set of primers and a specific probe for *MSRV* [31] and for the HKG gene *GUS-B* (Applied Biosystems). Several controls were included in the PCR runs: 1) "No RT" control of each sample to detect possible DNA contamination; 2) RT positive control; 3) PCR control. Thus, the assays for the detection of *GUS-B* and *MSRV env* were considered acceptable in each sample when: 1) RT positive control and PCR control did not differ more than 2% on Ct basis; 2) Ct of HKG was lower than Mean + 2\*S.D of HKG of all samples; 3) no amplification was detected in the "no RT" control; and 4) the duplicates of each sample had less than 2% of variability on Ct basis [46].

*MSRV* relative expression was measured by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  relative method [45]: *MSRV* Relative Expression =



$2e^{-\Delta\Delta Ct} = 2e^{-(\Delta Ct_{\text{sample}} - \text{Mean}\Delta Ct_{\text{blood donors}})} = 2e^{-((Ct_{\text{MSRV}} - Ct_{\text{GUSB}})_{\text{sample}} - \text{Mean}(Ct_{\text{MSRV}} - Ct_{\text{GUSB}})_{\text{Blood Donors}})}$ . The mean of the  $\Delta Ct$  of all the Blood Donors was used as the calibrator in all the expression analysis.

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 15.0. Linkage disequilibrium values ( $D'$ ) and Hardy-Weinberg equilibrium (H-W) were tested with Haploview 4.0 software. Chi-Square test ( $\chi^2$ ) was used to compare allele and genotype frequencies. The Mantel-Haenszel (MH) test was used to perform the meta-analysis of allele and genotype frequencies of the two cohorts combined. MSRV relative expression was not normally distributed, therefore U-Mann Whitney test was used to compare MSRV relative expression between two groups. The non-parametric Spearman test was applied in order to evaluate the correlation between two variables. Statistically significant differences were considered when  $p$ -value < 0.05.

### Additional file

**Additional file 1: Table S1.** Primers used for mapping *HERV-W* region in chromosome Xq22.3.

### Abbreviations

MS: Multiple sclerosis; MSRV: Multiple sclerosis associated retrovirus; HERVs: Human endogenous retroviruses; LTR: Long terminal repeat; ORF: Open reading frame; TLR: Toll-like receptor; BD: Blood donor; RR: Relapsing-remitting; SP: Secondary progressive; MSSS: Multiple sclerosis severity score; HRM: High resolution melting; CSF: Cerebrospinal fluid; EBV: Epstein-barr virus; HHV-6: Human herpesvirus-6; HKG: Housekeeping gene.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Authors' contributions

MGM participated in the design of the study, carried out the expression analysis, performed statistical analysis and drafted the manuscript. BH carried out the HRM analysis, genotyping, sequencing and performed statistical analysis. JV participated in the design of the study, designed the primers and performed statistical analysis. AE and IC performed part of the molecular genetics studies. MDM, AAL and AGM prepared the samples for genetic and expression studies. IC, GI, ML and RA collected clinical data and samples from the patients. MF, AA FM carried out genotyping of samples. RA, FM, EU and RAL have been involved in the conception and design of the study and supervised the work. All the authors have revised critically the manuscript and approved the final version.

### Acknowledgements

The authors thank M. C. Ramírez and M.J. Díez, who collected the specimens, and C. Martínez, for her skilful technical assistance.

### Financial disclosure

M. García-Montojo, M. Domínguez-Mozo and A. Arias-Leal are recipient of contracts of "Fundación para la Investigación Biomédica-Hospital Clínico San Carlos". R. Alvarez-Lafuente is recipient of a research contract of the Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Feder) (CP07/00273). M.A. García-Martínez is recipient of a technician contract from "REEM: Red Española de Esclerosis Múltiple" (RETICS-REEM RD07/0060; www.reem.es).

B. de la Hera is recipient of a PhD scholarship from 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' (FI11/00560), J. Varade is recipient of a contract from "Ministerio de Economía y Competitividad"(PTA2011-6137-1) and E. Urcelay works for the "Fundación para la Investigación Biomédica-Hospital Clínico San Carlos". This work was supported by grants from: Instituto de Salud Carlos III-Fondo Investigaciones Sanitarias FIS (10/01985 and 09/02074), Fundación Genzyme, Fundación Alicia Koplowitz, Fundación Mutua Madrileña, and Fundación LAIR. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

### Author details

<sup>1</sup>Multiple Sclerosis Unit, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, Profesor Martín Lagos s/n., 28240, Madrid, Spain. <sup>2</sup>Immunology Department, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos, Profesor Martín Lagos s/n., 28240, Madrid, Spain. <sup>3</sup>Multiple Sclerosis Unit, Hospital Virgen Macarena, Av. Dr. Fedriani, 3., 41071, Sevilla, Spain. <sup>4</sup>Molecular Biology Department, Hospital Virgen Macarena, Av. Dr. Fedriani, 3., 41071, Sevilla, Spain. <sup>5</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina 'Lopez-Neyra'-CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Av. del Conocimiento s/n., 18016, Armilla (Granada), Spain.

Received: 10 July 2013 Accepted: 16 December 2013

Published: 9 January 2014

### References

- Lower R, Lower J, Kurth R: The viruses in all of us: characteristics and biological significance of human endogenous retrovirus sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, **93**:5177-5184.
- Blond JL, Lavillette D, Cheynet V, Bouton O, Oriol G, Chapel-Fernandes S, et al: An envelope glycoprotein of the human endogenous retrovirus HERV-W is expressed in the human placenta and fuses cells expressing the type D mammalian retrovirus receptor. *J Virol* 2000, **74**:3321-3329.
- Wang-Johanning F, Rycak K, Plummer JB, Li M, Yin B, Frerich K, et al: Immunotherapeutic potential of anti-human endogenous retrovirus-k envelope protein antibodies in targeting breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 2012, **104**:189-210.
- Liang Q, Xu Z, Xu R, Wu L, Zheng S: Expression patterns of non-coding spliced transcripts from human endogenous retrovirus HERV-H elements in colon cancer. *PLoS One* 2012, **7**:e29950.
- Goering W, Ribarska T, Schulz WA: Selective changes of retroelement expression in human prostate cancer. *Carcinogenesis* 2011, **32**:1484-1492.
- Rakoff-Nahoum S, Kuebler PJ, Heymann JJ, Sheehy E, Ortiz M, Ogg S, et al: Detection of T lymphocytes specific for human endogenous retrovirus K (HERV-K) in patients with seminoma. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006, **22**:52-56.
- Muster T, Waltenberger A, Grassauer A, Hirschl S, Caucig P, Romirer I, et al: An endogenous retrovirus derived from human melanoma cells. *Cancer Res* 2003, **63**:8735-8741.
- Perron H, Hamdani N, Faucard R, Lajnef M, Jamain S, ban-Huard C, et al: Molecular characteristics of Human Endogenous Retrovirus type-W in schizophrenia and bipolar disorder. *Transl Psychiatry* 2012, **2**:e201.
- Yolken RH, Karlsson H, Yee F, Johnston-Wilson NL, Torrey EF: Endogenous retroviruses and schizophrenia. *Brain Res Brain Res Rev* 2000, **31**:193-199.
- Yao Y, Schroder J, Nellaker C, Bottmer C, Bachmann S, Yolken RH, et al: Elevated levels of human endogenous retrovirus-W transcripts in blood cells from patients with first episode schizophrenia. *Genes Brain Behav* 2008, **7**:103-112.
- Nakagawa K, Brusic V, McColl G, Harrison LC: Direct evidence for the expression of multiple endogenous retroviruses in the synovial compartment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1997, **40**:627-638.
- Perron H, Germi R, Bernard C, Garcia-Montojo M, Deluen C, Farinelli L, et al: Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Mult Scler* 2012.
- Christensen T, Dissing SP, Riemann H, Hansen HJ, Munch M, Haahr S, et al: Molecular characterization of HERV-H variants associated with multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2000, **101**:229-238.
- Antony JM, Deslauriers AM, Bhat RK, Ellestad KK, Power C: Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: innocent bystanders or disease determinants? *Biochim Biophys Acta* 1812, 2011:162-176.



15. Garson JA, Tuke PW, Giraud P, Paranhos-Baccala G, Perron H: **Detection of virion-associated MSRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis.** *Lancet* 1998, **351**:33.
16. Serra C, Sotgiu S, Mameli G, Pugliatti M, Rosati G, Dolei A: **Multiple sclerosis and multiple sclerosis-associated retrovirus in Sardinia.** *Neural Sci* 2001, **22**:171–173.
17. Perron H, Lazarini F, Ruprecht K, Pechoux-Longin C, Seilhean D, Szadovitch V, et al: **Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions.** *J Neurovirol* 2005, **11**:23–33.
18. Mameli G, Astone V, Arru G, Marconi S, Lovato L, Serra C, et al: **Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6.** *J Gen Virol* 2007, **88**:264–274.
19. Antony JM, Izad M, Bar-Or A, Warren KG, Vojdani M, Mallet F, et al: **Quantitative analysis of human endogenous retrovirus-W env in neuroinflammatory diseases.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2006, **22**:1253–1259.
20. García-Montojo M, Domínguez-Mozo M, Arias-Leal A, García-Martínez A, de Las Heras V, Casanova I, et al: **The DNA copy number of human endogenous retrovirus-W (MSRV-type) is increased in multiple sclerosis patients and is influenced by gender and disease severity.** *PLoS One* 2013, **8**(1). Ref Type: Generic.
21. Zawada M, Liwien I, Pernak M, Januszkiewicz-Lewandowska D, Nowicka-Kujawska K, Rembowska J, et al: **MSRV pol sequence copy number as a potential marker of multiple sclerosis.** *Pol J Pharmacol* 2003, **55**:869–875.
22. Mameli G, Serra C, Astone V, Castellazzi M, Poddighe L, Fainardi E, et al: **Inhibition of multiple-sclerosis-associated retrovirus as biomarker of interferon therapy.** *J Neurovirol* 2008, **14**:73–77.
23. Saresella M, Rolland A, Marventano I, Cavarretta R, Caputo D, Marche P, et al: **Multiple sclerosis-associated retroviral agent (MSRV)-stimulated cytokine production in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis.** *Mult Scler* 2009, **15**:443–447.
24. Rolland A, Jouvin-Marche E, Viret C, Faure M, Perron H, Marche PN: **The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses.** *J Immunol* 2006, **176**:7636–7644.
25. Perron H, Jouvin-Marche E, Michel M, Ounanian-Paraz A, Camelo S, Dumon A, et al: **Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation.** *Virology* 2001, **287**:321–332.
26. Firouzi R, Rolland A, Michel M, Jouvin-Marche E, Hauw JJ, Malcus-Vocanson C, et al: **Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model.** *J Neurovirol* 2003, **9**:79–93.
27. Laufer G, Mayer J, Mueller BF, Mueller-Lantzsch N, Ruprecht K: **Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W env loci clarifies the origin of multiple sclerosis-associated retrovirus env sequences.** *Retrovirology* 2009, **6**:37.
28. Pavlicek A, Paces J, Elleder D, Hejnar J: **Processed pseudogenes of human endogenous retroviruses generated by LINEs: their integration, stability, and distribution.** *Genome Res* 2002, **12**:391–399.
29. Voisset C, Bouton O, Bedin F, Duret L, Mandrand B, Mallet F, et al: **Chromosomal distribution and coding capacity of the human endogenous retrovirus HERV-W family.** *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000, **16**:731–740.
30. Roebke C, Wahl S, Laufer G, Stadelmann C, Sauter M, Mueller-Lantzsch N, et al: **An N-terminally truncated envelope protein encoded by a human endogenous retrovirus W locus on chromosome Xq22.3.** *Retrovirology* 2010, **7**:69.
31. Mameli G, Poddighe L, Astone V, Delogu G, Arru G, Sotgiu S, et al: **Novel reliable real-time PCR for differential detection of MSRVenv and syncytin-1 in RNA and DNA from patients with multiple sclerosis.** *J Virol Methods* 2009, **161**:98–106.
32. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, et al: **Multiple sclerosis severity score: using disability and disease duration to rate disease severity.** *Neurology* 2005, **64**:1144–1151.
33. Mameli G, Poddighe L, Mei A, Uleri E, Sotgiu S, Serra C, et al: **Expression and activation by Epstein Barr virus of human endogenous retroviruses-W in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis.** *PLoS One* 2012, **7**:e44991.
34. Brudek T, Lühdorf P, Christensen T, Hansen HJ, Møller-Larsen A: **Activation of endogenous retrovirus reverse transcriptase in multiple sclerosis patient lymphocytes by inactivated HSV-1, HHV-6 and VZV.** *J Neuroimmunol* 2007, **187**:147–155.
35. Koch-Henriksen N, Sørensen PS: **The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology.** *Lancet Neurol* 2010, **9**:520–532.
36. Duquette P, Pleines J, Girard M, Charest L, Senecal-Quevillon M, Masse C: **The increased susceptibility of women to multiple sclerosis.** *Can J Neurol Sci* 1992, **19**:466–471.
37. Ramagopalan SV, Yee IM, Dymant DA, Orton SM, Marrie RA, Sadovnick AD, et al: **Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations from interracial matings.** *Neurology* 2009, **73**:602–605.
38. Ebers GC, Sadovnick AD, Dymant DA, Yee IM, Willer CJ, Risch N: **Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings.** *Lancet* 2004, **363**:1773–1774.
39. Pozzilli C, Tomassini V, Marinelli F, Paolillo A, Gasperini C, Bastianello S: **'Gender gap' in multiple sclerosis: magnetic resonance imaging evidence.** *Eur J Neurol* 2003, **10**:95–97.
40. Voskuhl RR, Gold SM: **Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression.** *Nat Rev Neurol* 2012, **8**:255–263.
41. Bianchi I, Lleo A, Gershwin ME, Invernizzi P: **The X chromosome and immune associated genes.** *J Autoimmun* 2012, **38**:J187–J192.
42. Curtin F, Lang AB, Perron H, Laumonier M, Vidal V, Porchet HC, Hartung HP: **GNBAC1, a humanized monoclonal antibody against the envelope protein of multiple sclerosis associated endogenous retrovirus: a first in-humans randomized clinical study.** *Clin Ther* 2012, **34**:2268–2278.
43. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al: **Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis.** *Ann Neurol* 2001, **50**:121–127.
44. Rozen S, Skaletsky HJ: **Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers.** In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Edited by Krawetz S, Misener S. Totowa, NJ: Humana Press; 2000:365–386.
45. Schmittgen TD, Livak KJ: **Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.** *Nat Protoc* 2008, **3**:1101–1108.
46. Pfaffl MW: **Quantification strategies in real-time PCR.** In *A-Z of quantitative PCR*. 3rd edition. Edited by Bustin SA. La Jolla, CA, USA: International University Line (IUL); 2004:97.

doi:10.1186/1742-4690-11-2

**Cite this article as:** García-Montojo et al.: HERV-W polymorphism in chromosome X is associated with multiple sclerosis risk and with differential expression of MSRV. *Retrovirology* 2014 **11**:2.

**Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
www.biomedcentral.com/submit







## Multiple sclerosis retrovirus-like *envelope* gene: Role of the chromosome 20 insertion

Jezabel Varadé <sup>a,1</sup>, Marta García-Montojo <sup>b,1</sup>, Belén de la Hera <sup>a,1</sup>, Iris Camacho <sup>a</sup>, M<sup>a</sup>. Ángel García-Martínez <sup>a</sup>, Rafael Arroyo <sup>b</sup>, Roberto Álvarez-Lafuente <sup>b,2</sup>, Elena Urcelay <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Immunology Dept., Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain

<sup>b</sup> Multiple Sclerosis Unit, Neurology Dept., Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), 28040 Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 December 2014

Received in revised form 9 February 2015

Accepted 12 February 2015

Available online 19 February 2015

#### Keywords:

Human endogenous retrovirus HERV-W

MSRV

Multiple sclerosis

Genetic susceptibility

### ABSTRACT

**Background:** The genetic basis involved in multiple sclerosis (MS) susceptibility was not completely revealed by genome-wide association studies. Part of it could lie in repetitive sequences, as those corresponding to human Endogenous Retroviruses (HERVs). Retrovirus-like particles were isolated from MS patients and the genome of the MS-associated retrovirus (MSRV) was the founder of the HERV-W family. We aimed to ascertain which chromosomal origin encodes the pathogenic ENV protein by genomic analysis of the HERV-W insertions.

**Methods/results:** In silico analyses allowed to uncover putative open reading frames containing the specific sequence previously reported for MSRV-like *envelope* (*env*) detection. Out of the 261 genomic insertions of HERV-W *env*, only 9 copies harbor the specific primers and probe featuring MSRV-like *env*. The copy from chromosome 20 was further studied considering its size, a truncated homologue of the functional HERV-W *env* sequence encoding syncytin. High Resolution Melting analysis of this sequence identified two single nucleotide polymorphisms, subsequently genotyped by Taqman chemistry in 668 MS patients and 678 healthy controls. No significant association of these polymorphisms with MS risk was evidenced. Transcriptional activity of this MSRV-like *env* copy was detected in peripheral blood mononuclear cells from patients and controls. RNA expression levels of chromosome 20-specific MSRV-like *env* did not show significant differences between MS patients and controls, neither were related to genotypes of the two mentioned polymorphisms.

**Conclusions:** The lack of association with MS risk of the identified polymorphisms together with the transcription results discard chromosome 20 as genomic origin of MSRV-like *env*.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

### 1. Background

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory and neurodegenerative disease of the central nervous system affecting young adults [1]. Its precise etiology is not currently ascertained, but the prevailing hypothesis accepts the trigger of poorly-defined environmental factors acting in genetically susceptible individuals. The genetic background of these patients has been thoroughly studied and genome-wide association studies (GWAS) have increased significantly the number of loci identified in MS predisposition [2,3]. Nonetheless, the overall genetic load revealed by this robust approach does not seem to fully explain previous estimations based on epidemiologic studies [4]. Neither

the analysis of rare coding-region variants in known risk genes for autoimmune diseases clarified where the missing heritability lies [5]. In parallel, research on environmental factors has often pointed to different virus putatively related with this condition [6].

Retrovirus-like particles were observed in cell cultures of MS patients [7] and the genome of the MS-associated retrovirus, MSRV, was the founder member of a human Endogenous Retrovirus family, HERV-W [8]. Some time ago the repetitive sequences within the human genome were considered “junk DNA”, but this issue has been widely debated [9, 10] and recently, the ENCODE project has also questioned this gene-centric view of the genome [11]. Only about 1–3% of the genome corresponds to protein-coding sequences, while over 40% of the human DNA sequence holds repeated elements, and the endogenous retroviruses qualify for 8% of the total [12]. Most HERVs are defective for replication by the acquisition of stop codons, frameshift mutations and deletions [13]. Even so, MSRV virions have been reported in plasma and cerebrospinal fluid from MS patients and were associated with MS pathogenesis [8, 14–16]. Moreover, potent immunopathogenic properties mediated by T cells have been described in vivo for MSRV retroviral particles from MS

\* Corresponding author at: Immunology Department, Hospital Clínico San Carlos, IdISSC, Martín Lagos s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 330 3000x7171; fax: +34 91 330 3879.

E-mail address: [elena.urbelay@salud.madrid.org](mailto:elena.urbelay@salud.madrid.org) (E. Urbelay).

<sup>1</sup> Joint First Authors.

<sup>2</sup> Equal contributors.



cultures [17] and the MSRV envelope (ENV) protein was claimed to be responsible for the observed damage [18,19]. Additionally, a recent study demonstrated that the protein MSRV ENV can be used instead of a mycobacterial lysate to induce Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) [20].

The HERV-W retrovirus family is inserted into hundreds of genomic positions [21]; approximately half of them have been reduced to solitary LTRs through evolution and most of the remaining copies have rendered defective. The complete MSRV genome is around 7700-nucleotide long, with RU5, *gag*, *pol*, *env*, and U3R regions [22]. One functional HERV-W *env* copy from chromosome 7 codes the physiological syncytin [23]. Mameli and collaborators discovered a 12-nucleotide insertion in the transmembrane moiety of the MSRV *env* gene, which was absent from the syncytin genetic copy and might enable its discrimination [24]. Based on this insertion, the authors confirmed the link between MS and MSRV and concluded that syncytin expression does not differ in PBMCs from MS patients and controls [24]. Since the integration site of the true MSRV is still unknown, the unique sequence that can be defined as MSRV *env* is the one detected in extracellular virus particles. Therefore, all the HERV-W *env* DNA sequences with the features of the virionic MSRV *env* (i.e. the 12 bp insertion) must be defined as “MSRV-like” *envs*.

A yet unresolved issue is the genomic origin of the MSRV ENV protein. The insertion in chromosome X which contains a shortened version of the *env* gene has been regarded as a good candidate, given that this *env* sequence would encode a truncated syncytin-like protein of 475 amino acids [25]. In fact, a polymorphism described in that chromosome X copy was found associated with MS predisposition and with differential expression of MSRV [26]. In the present work, we aimed to further explore the chromosomal origin of the HERV-W ENV involved in MS pathogenesis, as the origin found in chromosome X is not necessarily the only one. GWAS do not analyze repetitive sequences from the genome in their search for susceptibility factors, therefore we hypothesized that part of the yet-undiscovered heritability could reside in these repetitive sequences.

## 2. Methods

### 2.1. Patients and controls

The Spanish case-control study included a total of 668 MS patients (64% females) and 678 healthy controls (57% females), with mean ages of  $40 \pm 9$  y and  $41 \pm 17$  y, respectively. All Caucasian participants were recruited from a single center, Hospital Clínico San Carlos, Madrid. MS diagnosis was established according to McDonald's criteria [27]. MS patients [age at onset (mean  $\pm$  SD):  $26 \pm 9$  y] were classified in relapsing remitting (81%), primary progressive (9%) and secondary progressive (10%). None of the control subjects reported first or second degree relatives with any immune-mediated disease. All subjects were recruited

after written informed consent and the Ethics Committee from Hospital Clínico San Carlos approved this study. All research was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

### 2.2. In silico analysis

The MSRV-*env* sequence (AF331500) was aligned with the human genome assembly GRCh37.p5 using BLAST (<http://www.ensembl.org>). The query results were analyzed by pDRAW32 (developed by AcaClone, <http://www.acaclone.com>) to identify putative open reading frames (ORFs) containing the specific primers and probe reported for MSRV *env* RNA detection [24]. Then, sequences were compared using a multiple sequence alignment tool ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)) in order to find differential sequences for each insertion.

### 2.3. Expression analysis

RNA was extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from fresh blood by centrifugation in CPT tubes (Becton Dickinson), using the *Qiamp RNA Blood Mini* kit (Qiagen). After DNase treatment, RNA sample volumes adjusted to 10 ng/ $\mu$ l were retrotranscribed using *First Strand cDNA Synthesis* kit (Roche Diagnostics, S.L. Barcelona, Spain) with OligodT primers. Relative expression of MSRV *env* was measured by the  $2e^{-\Delta\Delta C_t}$  method. In short, quantitative real time PCR of the cDNA used a probe (CGCTCTAACTGCTTCCTGCT) and primers (forward: TATTGGGGAGGTGGCTGAT; reverse: GCTACAAATCATTCTCAAATGGA) designed using PRIMER3 v4.0 software (<http://frodo.wi.mit.edu/>) for MSRV-like *env* derived from chromosome 20, and Glucuronidase- $\beta$  as housekeeping gene (HKG, *GUS-B* assay from Applied Biosystems). Each amplification included samples with their no-RT controls to detect possible genomic DNA contamination. Assays for the detection of *GUS-B* and chromosome 20 HERV-W *env* were considered acceptable when: 1) the  $C_t$  for the HKG was lower than the Mean + 2 \* S.D. of all samples; 2) no amplification was detected in the no-RT control; and 3) duplicates of each sample presented less than 2% of variability on  $C_t$  basis.

### 2.4. High Resolution Melting (HRM) analysis of MSRV-like *env* locus in chromosome 20 and genotyping

A PCR preparatory step was conducted for this chromosomal region (for primers and PCR amplification conditions see Supplementary Table 1). The PCR product containing the MSRV-*env* region of chromosome 20 was diluted 1/80 on sterile water, and then used as template to perform HRM analysis with a set of 12 pairs of primers that were designed using PRIMER3 v4.0 software [28]. Melting curves were discriminated in a 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's recommendations.



**Fig. 1.** Scheme comparing the HERV-W *env* ORFs from chromosome 7 (syncytin), chromosome X and chromosome 20. Arrows represent transcript origins and asterisks depict stop codons. Black boxes at 1452 nt and at 1515 nt indicate the 12 bp insertion to identify MSRV-like *env*. Empty boxes: 12 bp deletion. Light and dark gray sequences indicate non homologous sequences compared with syncytin.

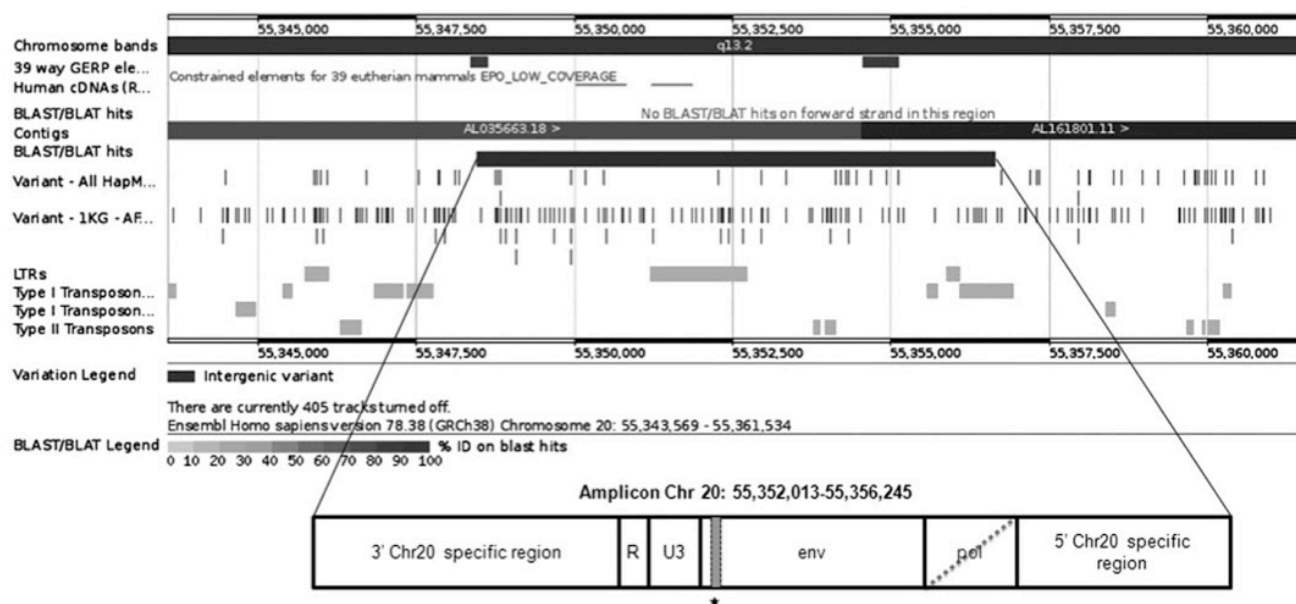


Fig. 2. The HERV-W insertion in chromosome 20. The insertion includes a truncated *pol* gene, an *env* gene with 88% homology to MSRV *env* and RU3 regions.

When a different pattern of melting curve was suggestive of the existence of a potential mutation or single nucleotide polymorphism (SNP), the sample was diluted 1/20 on sterile water and sequenced using *BigDye Cycle sequencing kit* (Applied Biosystems). Any variant confirmed by sequencing was then genotyped by TaqMan technology in a 7900HT Fast Real-Time PCR system, under conditions recommended by the manufacturer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

## 2.5. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using SPSS 15.0. Linkage disequilibrium values ( $D'$ ) and Hardy-Weinberg equilibrium were tested with Haploview 4.0 software. Chi-Square test was used to compare allele and genotype frequencies. Mann-Whitney U test was used to compare MSRV-like *env* relative expression between two groups. Statistically

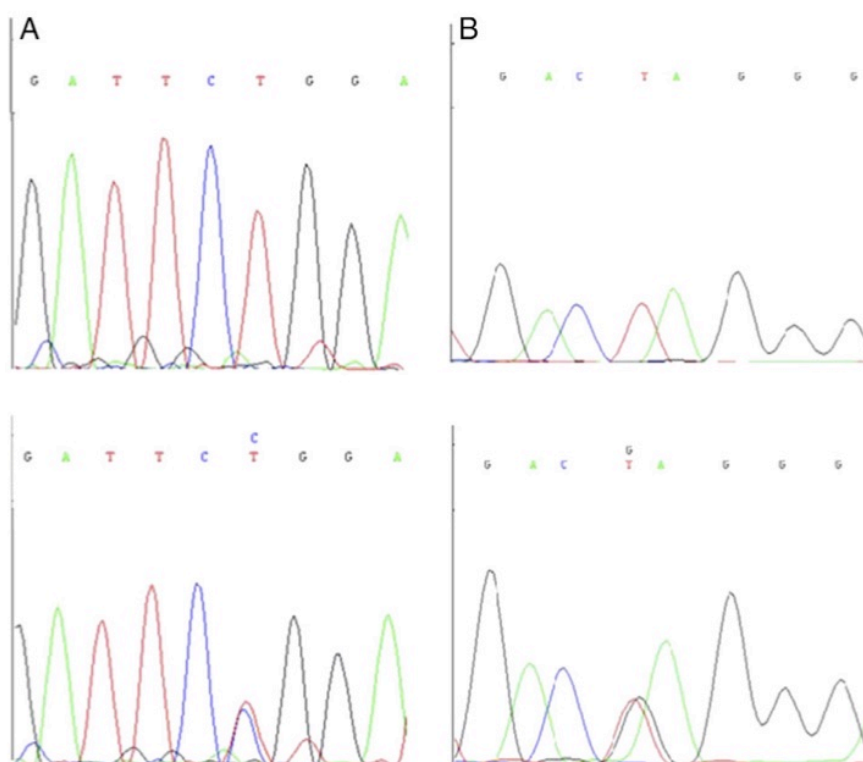


Fig. 3. Two single nucleotide polymorphisms (SNPs), T/C and T/G changes (NCBI\_snp# SNP1: 974293065 and SNP2: 974293066), identified within the HERV-W insertion in chromosome 20.



**Table 1**

Allelic and genotypic frequencies of both SNPs identified in the HERV-W copy of chromosome 20 in MS patients and controls.

SNP1	MS		Controls	
	n	%	n	%
TT	495	75	496	73
TC	153	23	168	25
CC	14	2	14	2
T	1143	86	1160	86
C	181	14	196	14

SNP2	MS		Controls	
	n	%	n	%
TT	652	99	652	98
TG	9	1	15	2
GG	0	0	0	0
GG	0	0	0	0
G	9	1	15	1

significant differences were considered when the p-value was lower than 0.05.

### 3. Results

In order to explore the genomic insertions of HERV-W *env* that match with the published MSRV *env* sequence (AF331500), homologies were searched in the human genome assembly GRCh37.p5 using BLAST (see Methods). The overall 261 sequences resulting from this query were analyzed by pDRAW32 to identify putative ORFs harboring the specific probe and primers reported for MSRV-like *env* RNA detection [24]. Only 9 out of the 261 sequences met these criteria and were selected for further analyses (Supplementary Fig. 1). From these genomic insertions of MSRV-like *env*, the two of them with ORFs around 10% shorter than the physiological syncytin (1617 bp) were: one located in chromosome X (1425 bp) and the other in chromosome 20 with 1416 bp (Fig. 1). The region of chromosome X which would encode a truncated syncytin protein has been previously studied [26] and in the present work we focused on the other plausible candidate in chromosome 20 (for protein alignments see Supplementary Fig. 2).

A preparative PCR amplification step from genomic DNA was conducted to isolate the specific MSRV-like *env* copy in chromosome 20 (Fig. 2), yielding a 4232 bp product used as template to perform HRM analysis in overlapping amplicons (for primers used and PCR conditions see

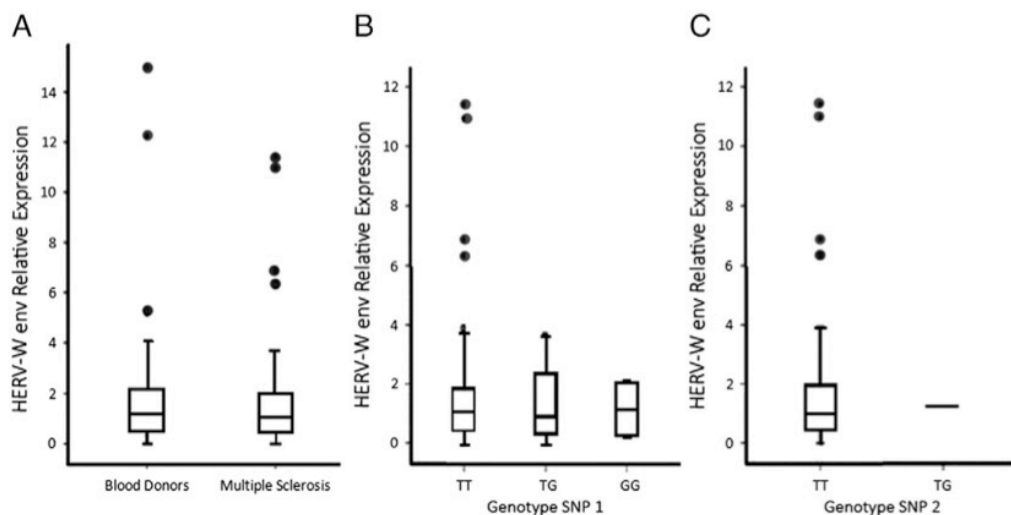
Supplementary Table 1). Whenever a potential variant was detected in an initial screening of 100 samples, it was validated by sequencing and then analyzed by TaqMan technology in the overall 668 MS patients and 678 healthy controls. Two SNPs were identified following this procedure: T/C and T/G changes at positions 221 and 285 from the beginning of the amplification product ( $D' = 35\%$ , NCBI\_ssn# SNP1: 974293065 and SNP2: 974293066) (Fig. 3).

Genotyping success was over 95% for both patient and control cohorts and no departure from Hardy–Weinberg equilibrium was observed. However, no significant differences were found in the allelic or genotypic frequencies between MS patients and ethnically matched controls ( $\chi^2$  test:  $p > 0.05$ , Table 1). Moreover, no significant associations (Mann–Whitney U test:  $p > 0.05$ ) were found between alleles or genotypes of these SNPs and the RNA expression of MSRV *env* specifically derived from the chromosome 20 copy (Fig. 4).

### 4. Discussion

In the present work, we aimed to shed some light on the genomic origin of the reported MSRV ENV protein previously identified as MS pathogenic co-factor. Specifically, we pursued to elucidate the putative role in MS risk of the insertion of MSRV-like *env* in chromosome 20 as one of the plausible candidates by size, together with the insertion in chromosome X already studied by our group [26]. Both chromosomal origins showed similar lengths of their respective ORFs, 10% shorter than the one measured for syncytin [29] and could putatively originate functional proteins. The ENV protein has been recently evidenced within *post-mortem* MS brain lesions [15,30–32]. MSRV ENV induces human monocytes to produce proinflammatory cytokines through engagement of CD14 and TLR4 [19]. Kremer and collaborators demonstrated that the ENV protein is present in close proximity to TLR4-expressing oligodendroglial precursor cells adjacent to MS lesions [33]. In addition, MSRV ENV triggers a maturation process in human dendritic cells driving a Th1-like differentiation [19].

We recently reported that the MSRV-like *env* copy number is increased in PBMCs of MS patients, as an elevated MSRV-like *env* load was observed in MS patients compared to controls ( $p = 4.15 \times 10^{-7}$ ) [34]. Moreover, in our cohort the transcription levels of MSRV-like *env* were higher in MS patients than in controls (Mann–Whitney U test:  $p = 0.004$ ) [26], consistent with previous findings [24,35]. Nonetheless, knowledge is still lacking about which chromosomal location(s) harboring specific retroviral copy(ies) originate(s) these induced levels of transcription. Once the RNA expression in PBMCs was



**Fig. 4.** Relative expression of HERV-W *env* copy on chromosome 20 in 52 MS patients and 53 healthy blood donors (A) and stratified by genotype of the identified SNPs (B and C). Lines inside the boxes represent medians, whiskers represent standard deviations.



validated (data not shown), we analyzed the insertions encoding modified envelope proteins: those derived from chromosomes X<sup>26</sup> and 20. It has been demonstrated that MSRV-like *env* expression in brain macrophages within MS lesions is consistent with the observed expression in MS PBMCs, supporting the rationale for its ex-vivo detection in peripheral blood [30]. Nonetheless, our findings regarding the transcriptionally active long ORF derived from chromosome 20 dismiss this copy as a predominant origin of the MSRV pathogenic effect.

Previous results of GWAS in MS demonstrated associations with three loci within chromosome 20 including the following genes: *CD40*, *TNFRSF6B* and *CYP24A1* [2], the latter at 1 Mb of the HERV-W insert studied in the present work. Considering that repetitive sequences of the genome have not been explored in the GWAS, this seemed an adequate analysis to advance in the unresolved issue of the missing heritability of this complex disease [4]. Moreover, one of the proposed co-factors repeatedly involved in the pathogenesis of MS is the Epstein–Barr virus, which was reported to activate in vitro the HERV-W family of human endogenous retroviruses [36]. The specific PCR amplification of the genomic region of chromosome 20 including the MSRV-like *env* sequence and subsequent HRM analysis led to the identification of two polymorphisms within this repetitive insertion. However, the performed case-control study did not detect significant differences in allelic or genotypic frequencies for these SNPs. Therefore, the results obtained in this study do not encourage further investigation of this MSRV-like *env* insertion as responsible of part of the genetic risk in MS patients. Despite the mentioned similar size of the two MSRV-like *env* copies from chromosomes 20 and X, apparent differences have been found between them. One polymorphism identified in chr. X, rs6622139\*T, was associated with higher MSRV-like *env* expression (Mann–Whitney U test:  $p = 0.003$ ), while the two polymorphisms found in chromosome 20 did not show evidence of association with chromosome 20-specific RNA expression levels. Additionally, rs6622139 was associated in women with MS susceptibility and severity [26]. These results point to the insertion in chromosome X and not the one in chromosome 20 as involved in the origin of MSRV ENV.

Suggestive of its potential pathogenic activity, significant decreases in seroreactivities to HERV-W envelope antigens, closely linked to efficacy of interferon-beta therapy were previously demonstrated [37] and recently, it has been reported that after one year therapy, natalizumab inhibits the plasma-membrane levels of the ENV protein in MS patients [38]. The challenge is now to turn the increasing knowledge in HERV-W to the clinical setting, as it has proven helpful in predicting therapy outcomes [34].

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbacli.2015.02.002>.

## Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

## Acknowledgments

This work was supported by: Instituto de Salud Carlos III-Fondo Europeo de Desarrollo Regional (Feder), Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS (P113/0879) and Fundaciones: Genzyme (to R.A.-L.); Lair (to R.A.) and Mutua Madrileña (to R.A.-L.). R.A.-L. is recipient of a research contract of the Instituto de Salud Carlos III- Feder (CP07/00273). M.A.G.-M. is recipient of a technician contract from the “REEM: Red Española de Esclerosis Múltiple” (RETICS-REEM RD12/0032/009; [www.reem.es](http://www.reem.es)). B.H. is recipient of a PhD scholarship from the “Fondo de Investigaciones Sanitarias” (FI11/00560), J.V. is recipient of a contract from the “Ministerio de Economía y Competitividad” (PTA2011-6137-1) and E.U. works for the FIB-Hospital Clínico San Carlos- IdiSSC. The authors do not disclose any conflict of interest.

## References

- [1] E.M. Frohman, et al., Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis, *N. Engl. J. Med.* 354 (2006) 942–955.
- [2] IMSCG, et al., Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis, *Nature* 476 (2011) 214–219.
- [3] IMSCG, et al., Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis, *Nat. Genet.* 45 (2013) 1353–1360.
- [4] T.A. Manolio, et al., Finding the missing heritability of complex diseases, *Nature* 461 (2009) 747–753.
- [5] K.A. Hunt, et al., Negligible impact of rare autoimmune-locus coding-region variants on missing heritability, *Nature* 498 (2013) 232–235.
- [6] A.E. Handel, et al., Genetic and environmental factors and the distribution of multiple sclerosis in Europe, *Eur. J. Neurol.* 17 (2010) 1210–1214.
- [7] H. Perron, et al., Isolation of retrovirus from patients with multiple sclerosis, *Lancet* 337 (1991) 862–863.
- [8] H. Perron, et al., Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94 (1997) 7583–7588.
- [9] P.N. Nelson, et al., Human endogenous retroviruses: transposable elements with potential? *Clin. Exp. Immunol.* 138 (2004) 1–9.
- [10] A. Dolei, Endogenous retroviruses and human disease, *Expert. Rev. Clin. Immunol.* 2 (2006) 149–167.
- [11] B.E. Bernstein, et al., An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome, *Nature* 489 (2012) 57–74.
- [12] F.P. Ryan, Human endogenous retroviruses in multiple sclerosis: potential for novel neuro-pharmacological research, *Curr. Neuropharmacol.* 9 (2011) 360–369.
- [13] N. de Parseval, et al., Comprehensive search for intra- and inter-specific sequence polymorphisms among coding envelope genes of retroviral origin found in the human genome: genes and pseudogenes, *BMC Genomics* 6 (2005) 117.
- [14] A. Dolei, et al., Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients, *Neurology* 58 (2002) 471–473.
- [15] G. Mameli, et al., Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6, *J. Gen. Virol.* 88 (2007) 264–274.
- [16] S. Sotgiu, et al., Multiple sclerosis-associated retrovirus and progressive disability of multiple sclerosis, *Mult. Scler.* 16 (2010) 1248–1251.
- [17] R. Firouzi, et al., Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model, *J. Neurovirol.* 9 (2003) 79–93.
- [18] H. Perron, et al., Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation, *Virology* 287 (2001) 321–332.
- [19] A. Rolland, et al., The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses, *J. Immunol.* 176 (2006) 7636–7644.
- [20] H. Perron, et al., Human endogenous retrovirus protein activates innate immunity and promotes experimental allergic encephalomyelitis in mice, *PLoS One* 8 (2013) e80128.
- [21] A. Pavlicek, et al., Processed pseudogenes of human endogenous retroviruses generated by LINEs: their integration, stability, and distribution, *Genome Res.* 12 (2002) 391–399.
- [22] F. Komurian-Pradel, et al., Molecular cloning and characterization of MSRV-related sequences associated with retrovirus-like particles, *Virology* 260 (1999) 1–9.
- [23] I. Kner, et al., Endogenous retroviral syncytin: compilation of experimental research on syncytin and its possible role in normal and disturbed human placentogenesis, *Mol. Hum. Reprod.* 10 (2004) 581–588.
- [24] G. Mameli, et al., Novel reliable real-time PCR for differential detection of MSRVenv and syncytin-1 in RNA and DNA from patients with multiple sclerosis, *J. Virol. Methods* 161 (2009) 98–106.
- [25] C. Roebke, et al., An N-terminally truncated envelope protein encoded by a human endogenous retrovirus W locus on chromosome Xq22.3, *Retrovirology* 7 (2010) 69.
- [26] M. Garcia-Montojo, et al., HERV-W polymorphism in chromosome X is associated with multiple sclerosis risk and with differential expression of MSRV, *Retrovirology* 11 (2014) 2.
- [27] W.I. McDonald, et al., Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis, *Ann. Neurol.* 50 (2001) 121–127.
- [28] S. Rozen, et al., Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers, *Methods Mol. Biol.* 132 (2000) 365–386.
- [29] S. Mi, et al., Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis, *Nature* 403 (2000) 785–789.
- [30] H. Perron, et al., Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease, *Mult. Scler.* 18 (2012) 1721–1736.
- [31] J.M. Antony, et al., Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination, *Nat. Neurosci.* 7 (2004) 1088–1095.
- [32] H. Perron, et al., Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions, *J. Neurovirol.* 11 (2005) 23–33.
- [33] D. Kremer, et al., Human endogenous retrovirus type W envelope protein inhibits oligodendroglial precursor cell differentiation, *Ann. Neurol.* 74 (2013) 721–732.
- [34] M. Garcia-Montojo, et al., The DNA copy number of human endogenous retrovirus-W (MSRV-type) is increased in multiple sclerosis patients and is influenced by gender and disease severity, *PLoS One* 8 (2013) e53623.

- [35] M. Zawada, et al., MSRV pol sequence copy number as a potential marker of multiple sclerosis, *Pol. J. Pharmacol.* 55 (2003) 869–875.
- [36] G. Marnett, et al., Expression and activation by Epstein Barr virus of human endogenous retroviruses-W in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis, *PLoS One* 7 (2012) e44991.
- [37] T. Petersen, et al., Effects of interferon-beta therapy on innate and adaptive immune responses to the human endogenous retroviruses HERV-H and HERV-W, cytokine production, and the lectin complement activation pathway in multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 215 (2009) 108–116.
- [38] G. Arru, et al., Natalizumab inhibits the expression of human endogenous retroviruses of the W family in multiple sclerosis patients: a longitudinal cohort study, *Mult. Scler.* 20 (2013) 174–182.



# Role of the Human Endogenous Retrovirus HERV-K18 in Autoimmune Disease Susceptibility: Study in the Spanish Population and Meta-Analysis

Belén de la Hera<sup>1</sup>\*, Jezabel Varadé<sup>1</sup>\*, Marta García-Montojo<sup>2</sup>\*, José Ramón Lamas<sup>3</sup>, Ana de la Encarnación<sup>1</sup>, Rafael Arroyo<sup>2</sup>, Benjamín Fernández-Gutiérrez<sup>3</sup>, Roberto Álvarez-Lafuente<sup>2</sup>\*, Elena Urcelay<sup>1</sup>\*,<sup>§</sup>

**1** Immunology Department, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain, **2** Multiple Sclerosis Unit, Neurology Department, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain, **3** Rheumatology Department, Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain

## Abstract

**Background:** Human endogenous retroviruses (HERVs) are genomic sequences that resulted from ancestral germ-line infections by exogenous retroviruses and therefore are transmitted in a Mendelian fashion. Increased HERV expression and antibodies to HERV antigens have been found in various autoimmune diseases. HERV-K18 in chromosome 1 was previously associated with type one diabetes and multiple sclerosis (MS). The etiology of these complex conditions has not been completely elucidated even after the powerful genome wide association studies (GWAS) performed. Nonetheless, this approach does not scrutinize the repetitive sequences within the genome, and part of the missing heritability could lie behind these sequences. We aimed at evaluating the role of HERV-K18 in chromosome 1 on autoimmune disease susceptibility.

**Methods:** Two HERV-K18 SNPs (97Y/C and 154W/Stop substitutions) conforming three haplotypes were genotyped in Spanish cohorts of multiple sclerosis (n = 942), rheumatoid arthritis (n = 462) and ethnically matched controls (n = 601). Our findings were pooled in a meta-analysis including 5312 autoimmune patients and 4032 controls.

**Results:** Significant associations of both HERV-K18 polymorphisms in chromosome 1 with MS patients stratified by HLA-DRB1\*15:01 were observed [97Y/C p = 0.02; OR (95% CI) = 1.5 (1.04–2.17) and 154W/Stop: p = 0.001; OR (95% CI) = 1.6 (1.19–2.16)]. Combined meta-analysis of the previously published association studies of HERV-K18 with different autoimmune diseases, together with data derived from Spanish cohorts, yielded a significant association of the HERV-K18.3 haplotype [97Y–154W: p<sub>M-H</sub> = 0.0008; OR<sub>M-H</sub> (95% CI) = 1.22 (1.09–1.38)].

**Conclusion:** Association of the HERV-K18.3 haplotype in chromosome 1 with autoimmune-disease susceptibility was confirmed through meta-analysis.

**Citation:** de la Hera B, Varadé J, García-Montojo M, Lamas JR, de la Encarnación A, et al. (2013) Role of the Human Endogenous Retrovirus HERV-K18 in Autoimmune Disease Susceptibility: Study in the Spanish Population and Meta-Analysis. PLoS ONE 8(4): e62090. doi:10.1371/journal.pone.0062090

**Editor:** Steven Jacobson, National Institutes of Health, United States of America

**Received:** January 25, 2013; **Accepted:** March 15, 2013; **Published:** April 25, 2013

**Copyright:** © 2013 de la Hera et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Belén de la Hera is recipient of a PhD scholarship from 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' (FI11/00560), Jezabel Varadé is recipient of a contract from "Ministerio de Economía y Competitividad" (PTA2011-6137-1) and Elena Urcelay works for the Fundación para la Investigación Biomédica-Hospital Clínico San Carlos. Financial support for the study was provided by: Fondo de Investigaciones Sanitarias FEDER-FIS (grant numbers: PI08/1636 and PI10/1985) and Fundación Alicia Koplowitz. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: eurcelay.hcsc@salud.madrid.org

§ These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Human endogenous retroviruses (HERVs) are sequences within the genome resulting from ancestral infections by exogenous retroviruses that were incorporated into germ-line DNA and therefore are inherited in a classical Mendelian pattern. They comprise approximately an 8% of the human genome [1] and have been detected in all vertebrates studied, including most apes, indicative of their evolutionary origin at least 25 million years ago. Different mechanisms have led to inactivation of most HERVs: recombination of their long terminal repeats with the excision of

the proviral genome, hypermethylation of HERV promoters or mutations preventing the expression of functional HERV proteins. These mechanisms would support the concept that HERVs constitute "junk" DNA, but mounting evidence questions this view as some of them have physiological or pathological functions. The best example of their physiological role in the host is that of the HERV-W envelope protein known as syncytin, encoded on chromosome 7. This fusogenic protein expressed in the placenta is involved in the formation of the syncytiotrophoblast and decreased placental expression of this protein has been linked with



pregnancy-induced hypertension [2]. An additional physiological role in spermatogenesis has been described for HERV-K in human males [3]. Moreover, the hypothesis that HERVs may be key factors in the pathogenesis of different diseases has been proposed. Apart from their specific expression reported in several cancer types, evidence of their pathogenic potential accumulates in a number of autoimmune diseases. Increased HERV expression from different families, as HERV-W, HERV-K or HERV-H, has been reported in rheumatoid arthritis (RA) [4], psoriasis [5], systemic lupus erythematosus [6] or multiple sclerosis (MS) [7–10]. Circulating antibodies to various HERV antigens have also been found in autoimmune patients [11]. Additionally, many reports show genetic association of different retrovirus with autoimmune diseases (i.e. association with MS of polymorphisms located near HERV-Fc or within a gen involved in retrovirus replication, *TRIM5* [12,13]).

In this study we focused on the influence of a copy of the HERV-K family, located in transcriptional antisense within the first intron of the *CD48* gene in chromosome 1q23.3. In 1997, Conrad and collaborators [14] found that the *env* gene of a new HERV-K endogenous retrovirus encoded a superantigen in insulin-dependent diabetes. Later, it was suggested that the tissue tropism of an exogenous virus might trigger the organ specific HERV-K18 superantigen response, leading to the expansion of autoreactive T cells [15]. Elevated HERV-K18 superantigen was also found in juvenile rheumatoid arthritis [16]. The HERV-K18 in chromosome 1 is an insert of 9235 bp with three variants and all of them encode superantigens [17]. Nonetheless, HERV-K18 expression might be a consequence rather than the cause of autoimmune conditions.

The search for the aetiology of these complex diseases has undergone a spectacular advance in recent times with the identification through genome wide association studies (GWAS) of literally hundreds of common single nucleotide polymorphisms (SNPs) involved in their susceptibility. However, although GWAS have provided valuable insights in the underlying causes of complex traits, they have explained relatively little of their heritability and the issue of where the “missing heritability” lies is a matter of debate [18]. There are several possible explanations as to the missing genetic basis. One of them points to the identified marker SNPs as imperfect proxies for the actual causal mutations that led to the association, which frequency could be low and would remain undetected. However, recent studies claim that rare variants in predisposition genes discovered by GWAS are not likely to make a large contribution to inherited risk in complex diseases [19]. Furthermore, gene-environment interactions may be relevant to fully elucidate the causes of these complex diseases. Another possible explanation is that repetitive sequences in the genome have not been adequately scrutinized through GWAS. With these considerations in mind, in the present work we aimed at studying the three haplotypes of HERV-K18 on chromosome 1 previously described associated with diabetes and MS risk [20,21] and at testing their influence on autoimmune disease susceptibility, provided the shared genetic susceptibility evidenced among these autoimmune conditions [22]. Additionally, increased HERV-K18 transcription was reported in cultured synoviocytes derived from biopsies of RA patients compared to controls [23]. A meta-analysis has been conducted including data from MS and RA Spanish cohorts combined with previously published results. In both traits, human herpesvirus 6 (HHV-6) or Epstein-Barr virus (EBV) infections have been often times outlined as environmental triggers of the diseases [24,25]. Moreover, HHV-6 and EBV induce transcriptional activation of the endogenous superantigen HERV-K18, independently of virus replication [26,27].

## Materials and Methods

### Ethics Statement

The study was approved by the Ethics Committee of the Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain. Patients and ethnically matched controls gave written informed consent.

### Meta-analysis

We performed a comprehensive search strategy of various electronic databases (MEDLINE (1966 - December 2012), Cochrane Database of Systematic Reviews (1991- December 2012) and EMBASE (1980- December 2012) by combining the terms: “HERV-K18”, “IDDMK(1,2)22” and “Human endogenous retrovirus-k18”. Additionally, a manual search of all references was conducted among the identified studies and relevant review articles (See Figure 1 and Checklist S1 ). This search rendered 37 articles published to date and all the association studies involved the copy on chromosome 1. Neither date nor language restrictions were imposed. The association studies considered for further analysis were required to hold information about *HERV-K18* haplotypes. We also included non published data from Hospital Clínico San Carlos (HCSC) cohort.

### Patients

The Spanish case-control study included 942 MS, 462 RA patients and 601 ethnically matched controls consecutively recruited from a single centre (Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain).

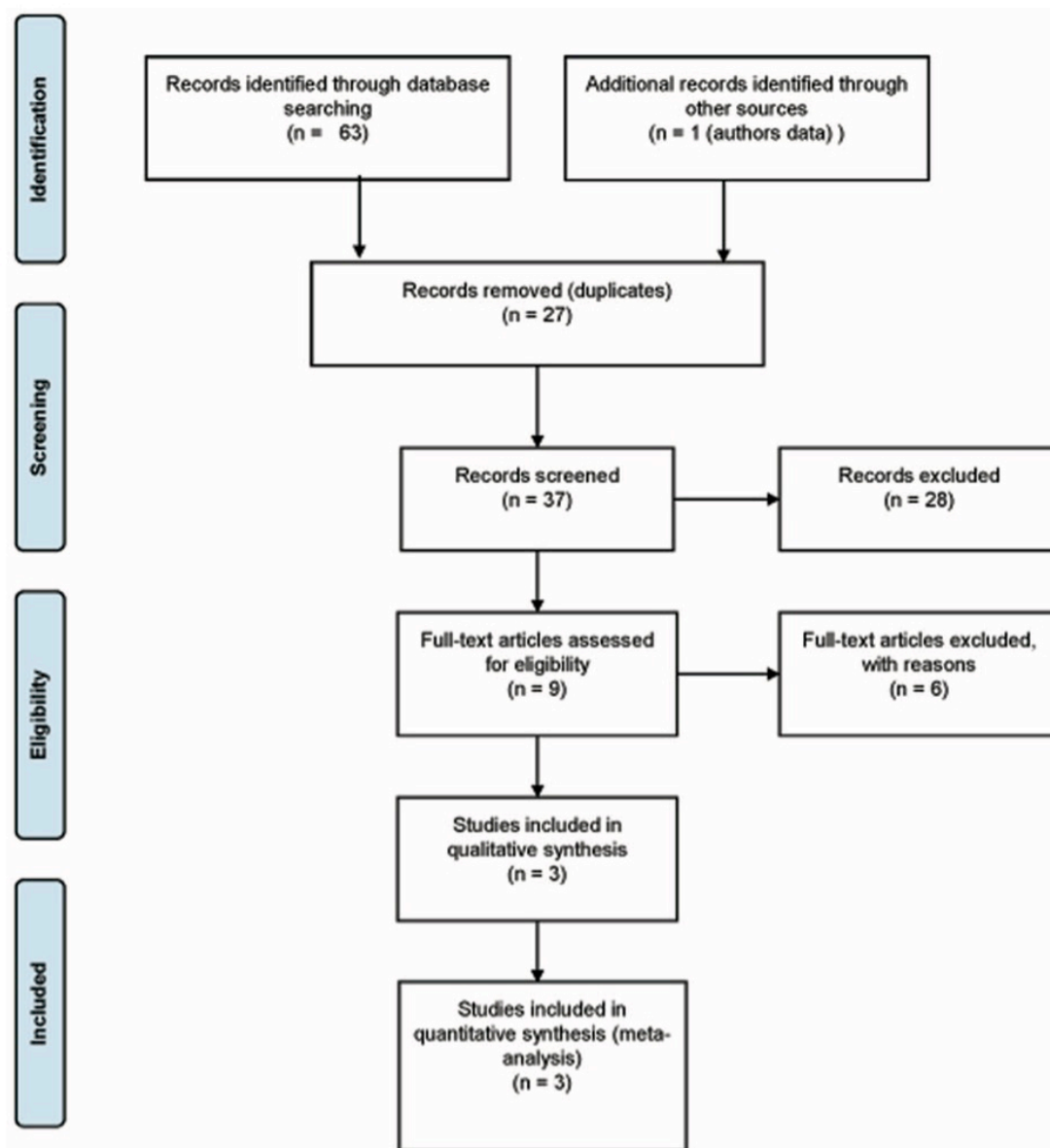
MS Spanish patients (63% female) were diagnosed based on the McDonald criteria [28] and 36% of them carried the human leukocyte antigen HLA *DRB1\*1501* risk allele. Most patients suffered relapsing remitting MS (79%), 11% of them showed the secondary progressive clinical form and 9% of them were classified as primary progressive patients. Their mean age at MS onset was  $29 \pm 9$ .

RA Spanish patients (74% female) were diagnosed according to American College of Rheumatology criteria [29]. The mean age of the RA patients at the time of disease onset was  $51 \pm 15$ , 56% of patients were shared epitope (SE) positive and 52% were anti-cyclic citrullinated peptide (anti-CCP) antibody positive. SE identification was achieved by using Lifecodes HLA-DRB Typing Kit (Tepnel Diagnostics Ltd., Abingdon, Oxon, UK).

### Genotyping

DNA was extracted from peripheral blood by a standard salting out method. A fragment of 6417 bp of HERV-K18 *env* (accession number AF333069, GRCh37.p10 (160666969–160673386); www.ensembl.org, October-2012) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) [Cycle conditions: initial denaturation: 94°C/5 min, 35 cycles: 94°C/30 sec, 62°C/30 sec, 68°C/5 min, and final extension of 68°C/10 min] using a primer located in the proviral sequence and the other mapping to the *CD48* sequence (5'-CCCACTCTAATG-CAAGCTC-3' and 5'-CATGGGAAATAGGGAAGCTG-3'). Within this amplicon, two SNPs, a Y/C substitution at amino acid position 97 (SNP1) and another W/Stop at position 154 (SNP2), discriminate the three haplotypes previously described (AF134984, Y18890, and AF333069) [20,21]. They were analyzed by Taqman technology using 384 well plates in a 7900HT Fast Real-Time PCR system, under the conditions recommended by the manufacturer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Genotyping success was over 95% for all





**Figure 1. Strategy used for the selection of studies finally included in the meta-analysis.**

doi:10.1371/journal.pone.0062090.g001

groups of patients and controls. No departure from Hardy Weinberg equilibrium was observed in the control group.

### Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with standard software (SPSS v15 and Review Manager RevMan v. 5.0.).

Haplotypic frequencies were estimated using the expectation-maximization and partition-ligation algorithms implemented in the Haploview software [30].

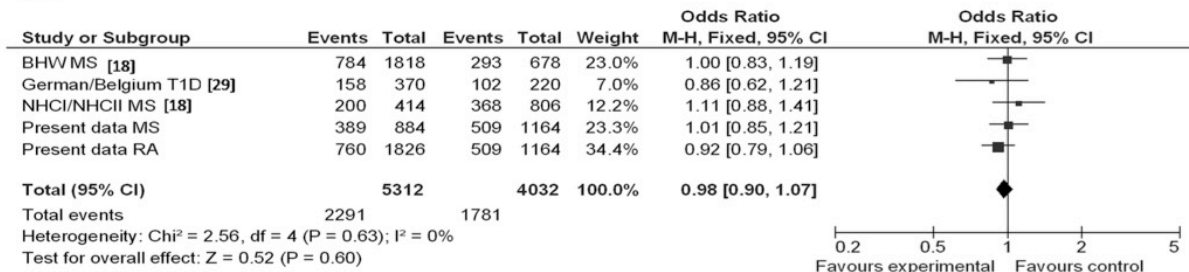
For the meta-analysis, Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated by using raw data for each study and for the pooled population. The Der Simonian and Laird random effects model was used according to the results of the tests

of heterogeneity. The combined effect for heterogeneity was calculated by taking the estimated inverse variance. The effect of each study was weighted for its number of patients. P value <0.10 defines a significant degree of heterogeneity and we also used the  $I^2$  statistic, with a cut-off point of 25%, to assess heterogeneity between the studies. A sensitivity analysis was performed to test the relative influence of each study on the results. Studies were sequentially dropped, and the effect on the change in the overall degree of heterogeneity was determined.

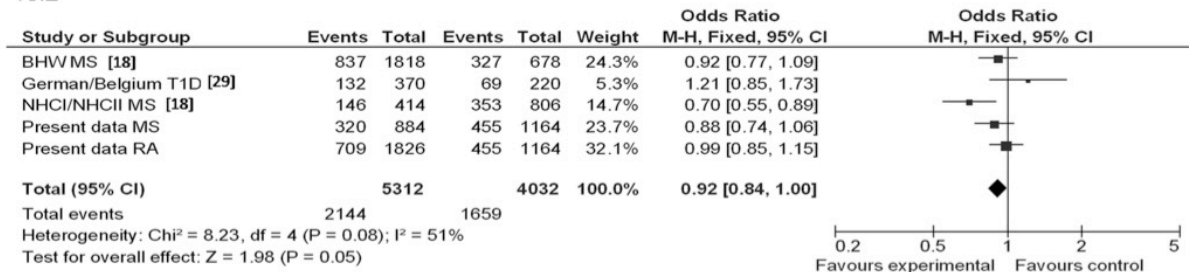
### Results

In order to ascertain the real impact of the HERV-K18 haplotypes in chromosome 1 on autoimmune disease risk, we

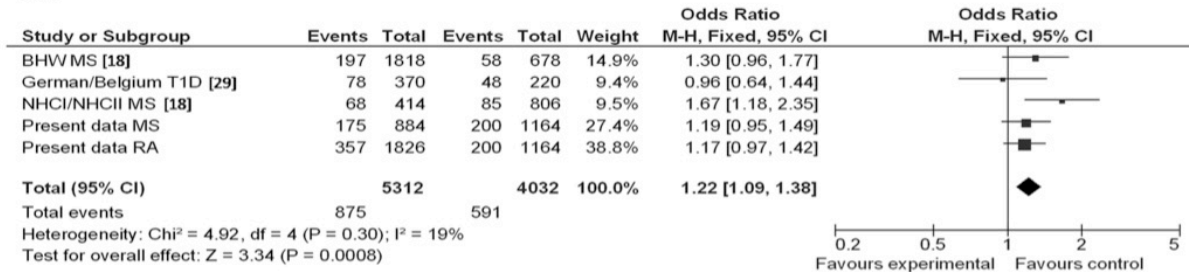
A)  
18.1



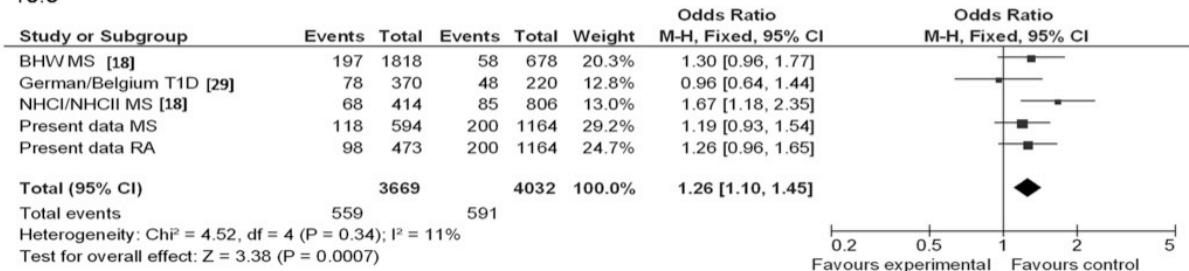
18.2



18.3



B)  
18.3



**Figure 2. Role of HERV-K18 haplotypes A) Meta-analysis of case-control studies in different autoimmune disease cohorts; B) Spanish data stratified by HLA susceptibility alleles (*DRB1\*15:01* in MS and shared epitope in RA).**

doi:10.1371/journal.pone.0062090.g002

performed a meta-analysis with 5312 patients and 4032 controls. After the systematic review, only 4 studies remained for further analysis [20,21,31,32]. Due to remarkable differences in allele

frequencies found between Japanese and European populations, data from a non-European ancestry study [32] were not included in the meta-analysis. Other Transmission Disequilibrium Test



**Table 1.** Genotypic frequencies of polymorphisms within the HERV-K18 sequence in autoimmune disease Spanish patients and controls.

		SNP1			SNP2		
		AA	AG	GG	GG	AG	AA
		n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Controls</b>		225 (37)	286 (48)	90 (15)	188 (31)	298 (50)	112 (19)
<b>MS</b>	<b>Overall</b>	372 (39)	417 (44)	153 (16)	334 (36)	422 (45)	175 (19)
	<b>1501</b>	1501 <sup>+</sup>	114 (37)	128 (42)	64 (21) <sup>1</sup>	128 (42) <sup>2</sup>	121 (40)
		1501 <sup>-</sup>	196 (39)	241 (48)	70 (14)	155 (31)	246 (49)
<b>RA</b>	<b>Overall</b>	197 (43)	192 (42)	65 (14)	132 (30)	231 (52)	79 (18)
	<b>SE</b>	SE <sup>+</sup>	107 (44)	105 (43)	31 (13)	65 (28)	133 (56)
		SE <sup>-</sup>	64 (40)	69 (43)	27 (17)	51 (32)	77 (49)

<sup>1</sup>GG vs AG+AA: MS 1501<sup>+</sup> vs 1501<sup>-</sup>: p=0.01; MS 1501<sup>+</sup> vs. Controls: p=0.02, OR (95%CI)=1.50 (1.04–2.17).

<sup>2</sup>GG vs AG+AA: MS 1501<sup>+</sup> vs 1501<sup>-</sup>: p=0.0009; MS 1501<sup>+</sup> vs. Controls: p=0.001, OR (95%CI)=1.60 (1.19–2.16).  
doi:10.1371/journal.pone.0062090.t001

(TDT) study lacking case-control data [20] was also discarded. Finally the meta-analysis pooled data from the previously published cohorts [21,31] and our MS and RA Spanish cohorts (Figure 2).

In the Spanish samples, a 6417 bp fragment of chromosome 1q22.3 was amplified by PCR using a primer located in the HERV-K18 *env* proviral sequence and the other mapping to the *CD48* sequence (as described in Methods). Case-control studies from the pre-amplified fragment of the Spanish samples were conducted with the two SNPs covering the haplotypic diversity of the HERV-K18 chromosomal region: a change Y/C at amino acid position 97 and another change W/Stop at 154. As shown in Fig. 2A, no association was observed for haplotype 18.1 (97Y-154Stop; SNP1\*A-SNP2\*A: p=0.60, OR=0.98) or for haplotype 18.2 after performing sensitivity analyses and eliminating the source of heterogeneity (97C-154W; SNP1\*G-SNP2\*G: p=0.31, OR=0.95). Haplotype 18.3 evidenced an overall effect [97Y-154W; SNP1\*A-SNP2\*G: p=0.0008; OR (95% CI)=1.22 (1.09–1.38)] with low heterogeneity among data of the reported cohorts and ours ( $I^2=19\%$ ). When the RA and MS Spanish cohorts were stratified by the HLA risk factor (Fig. 2B), the shared epitope alleles and HLA-*DRB1\*15:01* respectively, even higher homogeneity among cohorts was found ( $I^2=11\%$ ).

The genotypic frequencies for SNP1 and SNP2 in the Spanish patients and controls are summarized in Table 1. Significant differences were observed for both SNPs when MS patients were stratified by the well-known susceptibility factor HLA-*DRB1\*15:01* (MS 1501<sup>+</sup> vs. Controls: GG vs. AG+AA: p=0.02, OR=1.50 and p=0.001, OR=1.60, for SNP1 and SNP2 respectively). No significant association of the tested SNPs with RA risk was reached in the Spanish cohort, most probably due to statistical power restrictions.

## Discussion

Autoimmune diseases are multifactorial conditions determined by the interplay of environmental and genetic components. Particularly, viral infections have been proposed to trigger these diseases in the background of genetic predisposition. In both, multiple sclerosis and rheumatoid arthritis, the main genetic contribution was long ago attributed to specific human leukocyte antigen (HLA) class II alleles on the short arm of chromosome 6p21. Other genes increasing risk to both diseases have been

recently ascertained through GWAS [33,34], and a shared genetic background among them evidenced. However, the genetic component has been incompletely disentangled maybe due to partial coverage of the genome. In fact, associated genes which initially passed undetected by GWAS were sometimes identified through other experimental approaches. One limitation of whole genome association studies corresponds to the difficulty to unambiguously identify repetitive elements by the standard hybridization-based methods used, and consequently polymorphisms in HERVs would remain undetected in GWAS platforms. Prior amplification of genomic target regions, as the one performed in the present work, is required to successfully characterize endogenous retroviral sequences.

Our aim in the present work was the analysis of the role of the HERV-K18 haplotypes in chromosome 1 on autoimmune disease susceptibility. A search with the HERV-K18 *env* sequence (accession number AF333069, GRCh37.p10 (160666969–160673386); www.ensembl.org, October-2012) evidenced 332 positions in the genome showing total or partial homology, and 27 out of them presented over 85% homology and over 80% of the total length of HERV-K18 *env*. Among those 27 copies, 21 have open reading frames (ORFs) with one of both of the studied SNPs. No SNP previously found associated with any autoimmune disease through GWAS was observed in the 200 Kb- sequence surrounding those 27 copies. As mentioned above, we focused on the association previously observed within chromosome 1. Former studies regarding the association of HERV-K18 with other autoimmune disease, type 1 diabetes, reported apparently inconsistent results [20,31,32]. The genetic evidence presented here corroborates the HERV-K18 influence on autoimmune disease predisposition. Our data is fully concordant with a published report showing the involvement of HERV-K18 on the genetic risk to MS [21]. Provided that HERV-K18 superantigens are strictly dependent on Major Histocompatibility Complex class II for T cell activation, genetic epistasis between both loci is plausible and it seems from our data that a stronger association is found in the subgroup of MS patients carrying the HLA-*DRB1\*15:01* risk allele (Table 1).

Given the location of HERV-K18 within the intron of the *CD48* gene, the etiology of a putative *CD48* variant in linkage disequilibrium with the 18.3 haplotype found associated could not be disregarded. In terms of epigenetic regulation, the ENCODE project data show the signal of the H3K4ME1 histone



in the promoter region of *CD48* in an immortalized cell line of B lymphocytes, GM12873, indicative of a DNase hypersensitive site [35]. The impact of CD48 on T cell activation has been recognized with the description of severe T cell signaling defects in the CD48-knockout mouse [36]. T cells reorganize their surface molecules to form a well-structured contact zone with antigen presenting cells, known as immunological synapse, and CD48 in particular was firmly demonstrated to amplify T-cell receptor signaling [37]. Moreover, it has been recently reported that retrotransposable elements, including endogenous retroviruses, can act as an evolutionary mechanism for coordinately boosting the expression of many genes, suggesting that they become functional promoters [38].

The present results reside at the crossroads of environmental and genetic factors influencing autoimmune disease predisposition. Recently, mechanistic data about the transactivation of HERV-K18 by EBV have been released [39,40], and our work supports the role of the HERV-K18 haplotype on chromosome 1 in autoimmune pathogenesis. In summary, we report the association of the HERV-K18 18.3 haplotype on chromosome 1 with autoimmune disease susceptibility and further studies are war-

ranted to fully elucidate the specific mechanism underlying this association.

## Supporting Information

**Checklist S1 Reported items for meta-analysis.** (DOCX)

## Acknowledgments

We thank patients and controls for making this study feasible. Angel García-Martínez and Carmen Martínez provided expert technical assistance.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: BFG RAL EU. Performed the experiments: BdlH JV MGM JRL AdLE. Analyzed the data: BdlH JV MGM JRL AdLE RA BFG RAL EU. Contributed reagents/materials/analysis tools: RA BFG RAL EU. Wrote the paper: EU. Critically revised the manuscript: BdlH JV MGM JRL AdLE RA BFG RAL EU. Diagnosed, treated and recruited Spanish patients: RA BFG.

## References

- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 409: 860–921.
- Kudaka W, Oda T, Jinno Y, Yoshimi N, Aoki Y (2008) Cellular localization of placenta-specific human endogenous retrovirus (HERV) transcripts and their possible implication in pregnancy-induced hypertension. *Placenta* 29: 282–289.
- Prud'homme S, Bonnaud B, Mallet F (2005) Endogenous retroviruses and animal reproduction. *Cytogenet Genome Res* 110: 353–364.
- Nakagawa K, Brusic V, McColl G, Harrison LC (1997) Direct evidence for the expression of multiple endogenous retroviruses in the synovial compartment in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 40: 627–638.
- Moles JP, Tesniere A, Guilhou JJ (2005) A new endogenous retroviral sequence is expressed in skin of patients with psoriasis. *Br J Dermatol* 153: 83–89.
- Ogasawara H, Kageyama M, Yamaji K, Takasaki Y (2001) The possibility that autoimmune disease can be induced by a molecular mimicry mechanism between autoantigen and human endogenous retrovirus. *Lupus* 19: 111–113.
- Johnston JB, Silva C, Holden J, Warren KG, Clark AW, et al. (2001) Monocyte activation and differentiation augment human endogenous retrovirus expression: implications for inflammatory brain diseases. *Ann Neurol* 50: 434–442.
- Perron H, Lazarini F, Ruprecht K, Pechoux-Longin C, Seilhean D, et al. (2005) Human endogenous retrovirus (HERV)-W ENV and GAG proteins: physiological expression in human brain and pathophysiological modulation in multiple sclerosis lesions. *J Neurovirol* 11: 23–33.
- Brudek T, Christensen T, Aagaard L, Petersen T, Hansen HJ, et al. (2009) B cells and monocytes from patients with active multiple sclerosis exhibit increased surface expression of both HERV-H Env and HERV-W Env, accompanied by increased seroreactivity. *Retrovirology* 6: 104.
- Laska MJ, Brudek T, Nissen KK, Christensen T, Moller-Larsen A, et al. (2012) Expression of HERV-Fc1, a human endogenous retrovirus, is increased in patients with active multiple sclerosis. *J Virol* 86: 3713–3722.
- Bengtsson A, Blomberg J, Nived O, Pipkorn R, Toth L, et al. (1996) Selective antibody reactivity with peptides from human endogenous retroviruses and nonviral poly(amino acids) in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 39: 1654–1663.
- Nexo BA, Christensen T, Frederiksen J, Moller-Larsen A, Oturai AB, et al. (2011) The etiology of multiple sclerosis: genetic evidence for the involvement of the human endogenous retrovirus HERV-Fc1. *PLoS One* 6: e16652.
- Hansen B, Oturai AB, Harbo HF, Celius EG, Nissen KK, et al. (2011) Genetic association of multiple sclerosis with the marker rs391745 near the endogenous retroviral locus HERV-Fc1: analysis of disease subtypes. *PLoS One* 6: e26438.
- Conrad B, Weissmahr RN, Boni J, Arcari R, Schubach J, et al. (1997) A human endogenous retroviral superantigen as candidate autoimmune gene in type I diabetes. *Cell* 90: 303–313.
- Portis JL (2002) Perspectives on the role of endogenous human retroviruses in autoimmune diseases. *Virology* 296: 1–5.
- Sicat J, Sutkowski N, Huber BT (2005) Expression of human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen is elevated in juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 32: 1821–1831.
- Stauffer Y, Marguerat S, Meylan F, Ucla C, Sutkowski N, et al. (2001) Interferon-alpha-induced endogenous superantigen: a model linking environment and autoimmunity. *Immunity* 15: 591–601.
- Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorf LA, et al. (2009) Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature* 461: 747–753.
- Momozawa Y, Mni M, Nakamura K, Coppeters W, Almer S, et al. (2011) Resequencing of positional candidates identifies low frequency IL23R coding variants protecting against inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 43: 43–47.
- Marguerat S, Wang WY, Todd JA, Conrad B (2004) Association of human endogenous retrovirus K-18 polymorphisms with type 1 diabetes. *Diabetes* 53: 852–854.
- Tai AK, O'Reilly EJ, Alroy KA, Simon KC, Munger KL, et al. (2008) Human endogenous retrovirus-K18 Env as a risk factor in multiple sclerosis. *Mult Scler* 14: 1175–1180.
- Zhernakova A, van Diemen CC, Wijmenga C (2009) Detecting shared pathogenesis from the shared genetics of immune-related diseases. *Nat Rev Genet* 10: 43–55.
- Freimanis G, Hooley P, Ejtehadi HD, Ali HA, Veitch A, et al. (2010) A role for human endogenous retrovirus-K (HML-2) in rheumatoid arthritis: investigating mechanisms of pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 160: 340–347.
- Alvarez-Lafuente R, Fernandez-Gutierrez B, de Miguel S, Jover JA, Rollin R, et al. (2005) Potential relationship between herpes viruses and rheumatoid arthritis: analysis with quantitative real time polymerase chain reaction. *Ann Rheum Dis* 64: 1357–1359.
- Lunemann JD, Kamradt T, Martin R, Munz C (2007) Epstein-barr virus: environmental trigger of multiple sclerosis? *J Virol* 81: 6777–6784.
- Sutkowski N, Conrad B, Thorley-Lawson DA, Huber BT (2001) Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen. *Immunity* 15: 579–589.
- Turcanova VL, Bundgaard B, Hollberg P (2009) Human herpesvirus-6B induces expression of the human endogenous retrovirus K18-encoded superantigen. *J Clin Virol* 46: 15–19.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, et al. (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50: 121–127.
- Aletaha D, Neogi T, Silman AJ, Funovits J, Felson DT, et al. (2010) 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum* 62: 2569–2581.
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263–265.
- Ramos-Lopez E, Ghebru S, Van Autreve J, Aminkeng F, Herwig J, et al. (2006) Neither an intronic CA repeat within the CD48 gene nor the HERV-K18 polymorphisms are associated with type 1 diabetes. *Tissue Antigens* 68: 147–152.
- Kinjo Y, Matsuura N, Yokota Y, Ohtsu S, Nomoto K, et al. (2001) Identification of nonsynonymous polymorphisms in the superantigen-coding region of IDDMK1.2 22 and a pilot study on the association between IDDMK1.2 22 and type 1 diabetes. *J Hum Genet* 46: 712–716.
- Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, et al. (2011) Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476: 214–219.
- Stahl EA, Raychaudhuri S, Remmers EF, Xie G, Eyre S, et al. (2010) Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* 42: 508–514.



35. Rosenbloom KR, Dreszer TR, Long JC, Malladi VS, Sloan CA, et al. (2012) ENCODE whole-genome data in the UCSC Genome Browser: update 2012. *Nucleic Acids Res* 40: D912–917.
36. Gonzalez-Cabrero J, Wise CJ, Latchman Y, Freeman GJ, Sharpe AH, et al. (1999) CD48-deficient mice have a pronounced defect in CD4(+) T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 1019–1023.
37. Muhammad A, Schiller HB, Forster F, Eckerstorfer P, Geyeregger R, et al. (2009) Sequential cooperation of CD2 and CD48 in the buildup of the early TCR signalosome. *J Immunol* 182: 7672–7680.
38. Macfarlan TS, Gifford WD, Driscoll S, Lettieri K, Rowe HM, et al. (2012) Embryonic stem cell potency fluctuates with endogenous retrovirus activity. *Nature* 487: 57–63.
39. Hsiao FC, Lin M, Tai A, Chen G, Huber BT (2006) Cutting edge: Epstein-Barr virus transactivates the HERV-K18 superantigen by docking to the human complement receptor 2 (CD21) on primary B cells. *J Immunol* 177: 2056–2060.
40. Hsiao FC, Tai AK, Deglon A, Sutkowski N, Longnecker R, et al. (2009) EBV LMP-2A employs a novel mechanism to transactivate the HERV-K18 superantigen through its ITAM. *Virology* 385: 261–266.



# Human Endogenous Retrovirus HERV-Fc1 Association with Multiple Sclerosis Susceptibility: A Meta-Analysis

Belén de la Hera<sup>1,3</sup>, Jezabel Varadé<sup>1,3</sup>, Marta García-Montojo<sup>2</sup>, Antonio Alcina<sup>3</sup>, María Fedetz<sup>3</sup>, Iraide Alloza<sup>4</sup>, Ianire Astobiza<sup>4</sup>, Laura Leyva<sup>5</sup>, Oscar Fernández<sup>6</sup>, Guillermo Izquierdo<sup>7</sup>, Alfredo Antigüedad<sup>8</sup>, Rafael Arroyo<sup>2</sup>, Roberto Álvarez-Lafuente<sup>2</sup>, Koen Vandenbroeck<sup>4,9,10</sup>, Fuencisla Matesanz<sup>3</sup>, Elena Urcelay<sup>1\*</sup>

**1** Immunology Dept., Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain, **2** Multiple Sclerosis Unit, Neurology Dept., Hospital Clínico San Carlos, Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain, **3** Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra", Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Granada, Spain, **4** Neurogenomik Group, Universidad del País Vasco (UPV/EHU), Leioa, Spain, **5** Laboratorio de Investigación, Instituto de Neurociencias Clínicas, Hospital Regional Universitario, Málaga, Spain, **6** Servicio de Neurología, Instituto de Neurociencias Clínicas, Hospital Regional Universitario, Málaga, Spain, **7** Unidad de Esclerosis Múltiple, Hospital Virgen Macarena, Sevilla, Spain, **8** Servicio de Neurología, Hospital de Basurto, Bilbao, Spain, **9** Achucarro Basque Center for Neuroscience – UPV/EHU, Zamudio, Spain, **10** IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbao, Spain

## Abstract

**Background:** Human endogenous retroviruses (HERVs) are repetitive sequences derived from ancestral germ-line infections by exogenous retroviruses and different HERV families have been integrated in the genome. HERV-Fc1 in chromosome X has been previously associated with multiple sclerosis (MS) in Northern European populations. Additionally, HERV-Fc1 RNA levels of expression have been found increased in plasma of MS patients with active disease. Considering the North-South latitude gradient in MS prevalence, we aimed to evaluate the role of HERV-Fc1 on MS risk in three independent Spanish cohorts.

**Methods:** A single nucleotide polymorphism near HERV-Fc1, rs391745, was genotyped by Taqman chemistry in a total of 2473 MS patients and 3031 ethnically matched controls, consecutively recruited from: Northern (569 patients and 980 controls), Central (883 patients and 692 controls) and Southern (1021 patients and 1359 controls) Spain. Our results were pooled in a meta-analysis with previously published data.

**Results:** Significant associations of the HERV-Fc1 polymorphism with MS were observed in two Spanish cohorts and the combined meta-analysis with previous data yielded a significant association [rs391745 C-allele carriers:  $p_{M-H} = 0.0005$ ;  $OR_{M-H}$  (95% CI) = 1.27 (1.11–1.45)]. Concordantly to previous findings, when the analysis was restricted to relapsing remitting and secondary progressive MS samples, a slight enhancement in the strength of the association was observed [ $p_{M-H} = 0.0003$ ,  $OR_{M-H}$  (95% CI) = 1.32 (1.14–1.53)].

**Conclusion:** Association of the HERV-Fc1 polymorphism rs391745 with bout-onset MS susceptibility was confirmed in Southern European cohorts.

**Citation:** de la Hera B, Varadé J, García-Montojo M, Alcina A, Fedetz M, et al. (2014) Human Endogenous Retrovirus HERV-Fc1 Association with Multiple Sclerosis Susceptibility: A Meta-Analysis. PLoS ONE 9(3): e90182. doi:10.1371/journal.pone.0090182

**Editor:** Fernando de Castro, Hospital Nacional de Paraplégicos – SESCAM, Spain

**Received:** October 30, 2013; **Accepted:** January 27, 2014; **Published:** March 3, 2014

**Copyright:** © 2014 de la Hera et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Belén de la Hera is recipient of a PhD scholarship from "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (FI11/00560). Jezabel Varadé benefits from a contract of "Ministerio de Economía y Competitividad" (PTA2011-6137-1) and Elena Urcelay Works for the Fundación para la Investigación Biomédica-Hospital Clínico San Carlos. This is a collaborative study promoted by "REEM: Red Española de Esclerosis Múltiple" (RETICS-REEM RD12/0032/009; www.reem.es). The funders did not play any role in: study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: elena.urchel@salud.madrid.org

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a complex autoimmune disorder characterized by multifocal demyelination, axonal loss and neurodegeneration within the central nervous system of genetically susceptible individuals [1]. Clinical symptoms vary according to the location of the neurological lesions and patients often suffer an initial clinical isolated syndrome followed by a series of recurring-

remitting events with neurological impairment (RRMS). Usually patients recover their near normal neurological function after each episode, but with the course of the disease an irreversible progression of clinical disability termed secondary progression (SPMS) may appear and early therapeutic intervention is claimed to delay this process. In only 10–15% of MS patients a clinical progression from the debut of the disease is observed, referred to as primary progressive MS (PPMS).



MS aetiology remains elusive, but the prevailing hypothesis supports an underlying autoimmune process triggered by the interplay of not fully described environmental and genetic factors. The weight of either genetics or environment in the pathogenesis of MS is a matter of debate [2]. In terms of environmental factors, higher latitude has been reported to correlate with increased prevalence of MS [3] probably driven by differences in sunlight exposure and vitamin D levels [4,5], also repeatedly mentioned as environmental factors related with the risk of developing MS [6]. In addition, several viruses have been considered as triggers of MS, among them Epstein Barr virus [7,8], Herpes Simplex or human herpesviruses [9], which could be key players in the disease mediated through direct or indirect mechanisms.

The strongest genetic factor to date, the Human Leucocyte Antigen (HLA) locus was identified almost 40 years ago [10,11]. Subsequently, underpowered linkage and candidate gene association studies determined a slow progress in the discovery of new genetic risk factors. In the past five years, genome wide association scans (GWAS) including thousands of patients and controls have allowed an unprecedented increase in the list of predisposition factors described for MS [12,13]. Nonetheless, the individual effect of each variant is modest, with odds ratios ranging from 1.1 to 1.3. Moreover, the overall results of this statistically powerful approach account only partially for the MS heritability previously estimated by epidemiological studies. Approximately 30% of the genetic variation associated with MS is directly explained by variants represented by current GWAS arrays [14]. However, one should not forget that repetitive sequences of the genome skip the scanning of GWAS. Considering the results of the recently reported ENCODE project pointing to a pervasive transcription of the whole genome [15], these repetitive sequences could be potentially important to uncover part of the heritability not yet ascribed in these complex diseases.

An 8% of the repetitive sequences in the genome correspond to the so called human endogenous retroviruses (HERVs). They derived from the exogenous retroviral infection of the germline at different time points during evolution of the human lineage, and have been transmitted in a Mendelian fashion [16]. HERVs can be divided into distinct families, most of which resulted in multiple integrations of phylogenetically related but structurally heterogeneous elements. Host-retrovirus interactions influence the genomic landscape and have contributed substantially to mammalian genome evolution [17]. Some of the HERV families have been proposed to contribute to MS pathogenesis [18]. One of these HERV insertions associated with MS risk is HERV-Fc1, integrated about 10–15 million years ago [19]. Two subgroups exist in this family, HERV-Fc1 with only one component located in chromosome X and five related copies within the HERV-Fc2 subgroup. A polymorphism mapping close to the HERV-Fc1 copy located in chromosome X, rs391745, was found associated with MS in two out of the three Danish cohorts originally tested [20]. Then, further replication in a Norwegian cohort was achieved, revealing a specific association with bout-onset MS clinical forms [21]. Considering the mentioned effect of latitude on MS prevalence, we aimed to replicate the association of the HERV-Fc1 polymorphism rs391745 with relapsing remitting and secondary progressive MS in three independent Spanish cohorts, to ascertain whether the reported association is exclusive of higher latitudes in Europe or else is a general MS risk factor.

## Results

The first work providing genetic evidence for the involvement of HERV-Fc1 in the aetiology of MS and published by Nexø et al

[20] studied the polymorphism rs391745 in three Danish cohorts: the discovery cohort showed a strong association [OR (95%CI) = 2.29 (1.60–3.28)], and from the two cohorts subsequently analyzed, one yielded replication [OR (95%CI) = 1.43 (1.09–1.89)] but the other did not evidenced association with MS [OR (95%CI) = 1.01 (0.64–1.59)]. Later, the effect observed in Danish MS samples was replicated in a Norwegian cohort [OR (95%CI) = 1.35 (1–1.83)] [21]. However, considering the accepted latitude gradient affecting MS prevalence, we aimed to validate this effect in a population from Southern Europe and to meta-analyze these results and those previously published (see Fig. S1 and Fig. S2).

A total of 2473 MS patients (see Table 1 for clinical data from the three cohorts) and 3031 ethnically matched Spanish controls were genotyped for rs391745 (Table 2). Genotyping success was over 95% for all groups of patients and controls. No departure from Hardy Weinberg equilibrium in the control groups was observed.

As summarized in the forest plot depicted in Figure 1A, two out of the three tested Spanish cohorts showed significant associations of the rs391745\**C*-carriers with MS. However, in the cohort from Southern Spain an effect of the opposite allele could be detected. When heterogeneity was eliminated ( $I^2 = 0\%$ ) by excluding this latter South-Spanish cohort and the discovery Danish cohort from Nexø et al [20], which was probably over estimated due to the so called *winner's curse*, the overall meta-analysis by Mantel-Haenszel test evidenced a strong association [Fig. 1B;  $p_{M-H} = 0.0005$ ;  $OR_{M-H}$  (95%CI) = 1.27 (1.11–1.45)].

Additionally, the study by Hansen et al [21] that included part of the already mentioned Danish cohorts, reported a specific effect of this polymorphism in bout-onset MS; in contrast, lack of association was claimed for the primary progressive clinical form. In the present work (Figure 2), when validation was restricted to relapsing remitting and secondary progressive MS samples from the Spanish cohorts that did not show heterogeneity in the previous overall analysis, a slight improvement in the association was observed [Fig. 2B;  $p_{M-H} = 0.0003$ ;  $OR_{M-H}$  (95% CI) = 1.32 (1.14–1.53)]. Moreover, concordantly with the previous results, the pooled analysis of the primary progressive samples ( $n = 275$ ) did not seem to follow a similar trend for association [ $OR_{M-H}$  (95% CI) = 0.92 (0.63–1.34)], although a definitive conclusion was hampered by statistical power limitations.

The stratified analysis by gender or HLA-DRB1\*15:01 status did not detect any additional effect (Table 2).

## Discussion

The aim of this work was to validate the reported effect on MS susceptibility of a bi-allelic polymorphism located near the HERV-Fc1 insertion, rs391745, through genotyping of three independent Spanish cohorts. In the Northern European populations previously studied, this SNP located in chromosome X showed the most significant association amongst the 80 SNPs genotyped within a 20 Kb associated region which includes the endogenous retrovirus copy [20]. Environmental factors affecting MS have been recently reviewed [22] and the latitude gradient seems to be the more obvious, with a prevalence of MS oscillating more than 20 fold from very low levels near equator 5–10:100000 to 200:100000 in higher latitudes. In the present work, after a sensitivity analysis to remove the heterogeneous cohorts ( $I^2 = 0\%$ ), a significant overall association was observed [ $p_{M-H} = 0.0005$ ;  $OR_{M-H}$  (95% CI) = 1.27 (1.11–1.45)] suggestive of the role of the HERV-Fc1 insertion on MS predisposition.



**Table 1.** Demographic characteristics of the MS patients included in the study.

Characteristics	Northern Spain		Central Spain		Southern Spain	
	Patients	Controls	Patients	Controls	Patients	Controls
Subjects (n)	569	980	883	692	1021	1359
Female (%)	73	46	66	55	68	69
HLA DRB1*15:01 (%)	42	25	38	11	38	18
Age (yrs) (Mean $\pm$ SD)	42 $\pm$ 13	44 $\pm$ 9	45 $\pm$ 10	42 $\pm$ 17	44 $\pm$ 11	44 $\pm$ 9
Age at onset (yrs) (Mean $\pm$ SD)	31 $\pm$ 10	—	30 $\pm$ 9	—	28 $\pm$ 11	—
Clinical form:						
RR (n)	304	—	653	—	798	—
SP (n)	66	—	61	—	82	—
PP (n)	48	—	61	—	26	—

doi:10.1371/journal.pone.0090182.t001

The previously reported association was confirmed in cohorts from Northern and Central Spain, but a significant effect of the opposite allele was detected in the cohort from Southern Spain. This finding, already described in the literature as “flip-flop phenomenon” where significant associations for the same disease occur at opposite alleles of the same polymorphism, has been observed quite frequently [23]. Some authors hypothesized that this phenomenon can occur due to variation in linkage disequilibrium architecture [23], which is also present within the same ethnic origin [24]; while others explain it through differences in haplotypic frequencies [25]. Whatever the case, it has been proven that the probability of randomly observing a significant allele flip in samples ascertained similarly from a common population is negligible [26]. From this standpoint, the inclusion of the Southern Spanish cohort to the present meta-analysis considering association of the opposite allele would provide similar results [ $I^2 = 0\%$ ;  $p_{M-H} = 0.0002$ ;  $OR_{M-H}$  (95% CI) = 1.27 (1.12–1.45)].

As Figure 3 summarizes, rs391745 was not genotyped in the last genome-wide association studies reported by the IMSGC-WTCCC2 consortium [13]. Nonetheless, four SNPs localized upstream to the HERV-Fc1 provirus showed association with MS

even though they did not reach the GWAS threshold for significance (rs7881334,  $p = 0.002$ ; rs402270,  $p = 0.005$ ; rs318177,  $p = 0.0004$ ; rs2125324,  $p = 0.016$ ). These SNPs show high LD among them and their association with MS susceptibility is indicative of the relevance of this locus, although rs391745 shows low LD with these SNPs ( $r^2 < 0.47$ ). The Immunochip study, recently published in MS [27], was designed to deeply interrogate 184 non-MHC loci with genome-wide significant associations to at least one autoimmune disease, but none of them map to chromosome X where HERV-Fc1 is located, and therefore no additional information could be incorporated from this source.

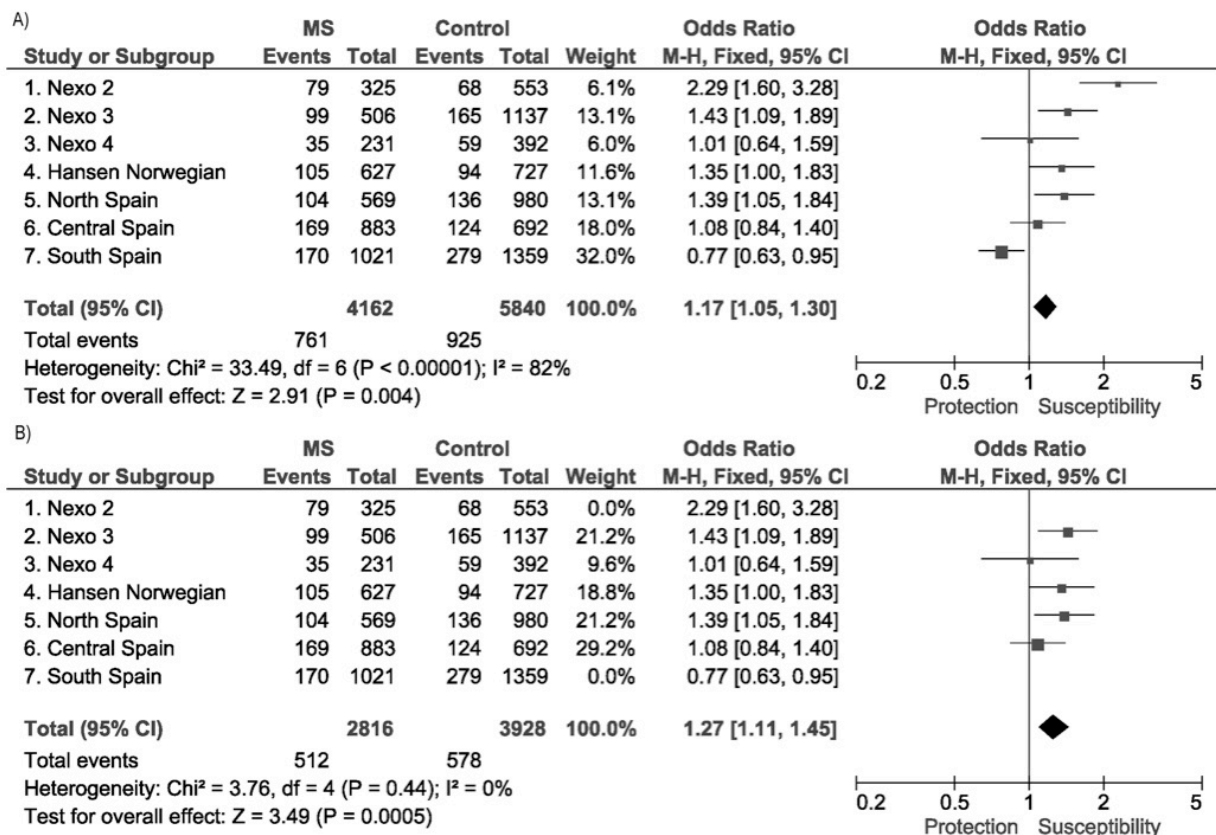
In parallel to the genetic factors already described for MS [13], the effect now validated on MS predisposition is modest. This could explain why the size of the cohorts led to a limited statistical power to consistently detect the observed association and one of the Danish cohorts originally tested did not show association with HERV-Fc1 [OR (95%CI) = 1.01 (0.64–4.59)].

The proviral insertion of HERV-Fc1 in chromosome X presents stop-codons and a frame-shift in the *pol* gene; however, the *gag* and *env* genes are complete. A 4-fold increase in extracellular HERV-Fc1 *gag* RNA titres has been described in patients with active MS

**Table 2.** Genotype frequencies of rs391745 in the Spanish cohorts included in the study.

			MS type	CC	CG	GG
				n (%)	n (%)	n (%)
Northern Spain	MS (n = 569)	Total		25 (4)	79 (14)	465 (82)
		15:01+		16 (7)	27 (11)	195 (82)
		15:01–		9 (3)	52 (16)	270 (81)
	Controls (n = 980)	Total		63 (6)	73 (7)	844 (86)
		15:01+		13 (4)	41 (13)	271 (83)
		15:01–		26 (5)	81 (15)	423 (80)
Central Spain	MS (n = 883)	Total		44 (5)	125 (14)	714 (81)
		15:01+		13 (4)	41 (13)	271 (83)
		15:01–		26 (5)	81 (15)	423 (80)
	Controls (n = 692)	Total		44 (6)	80 (12)	568 (82)
		15:01+		13 (6)	31 (13)	184 (81)
		15:01–		13 (4)	44 (12)	309 (84)
Southern Spain	MS (n = 1021)	Total		40 (4)	130 (13)	851 (83)
		15:01+		13 (6)	31 (13)	184 (81)
		15:01–		13 (4)	44 (12)	309 (84)
	Controls (n = 1359)	Total		71 (5)	208 (15)	1080 (80)
		15:01+		13 (6)	31 (13)	184 (81)
		15:01–		13 (4)	44 (12)	309 (84)

doi:10.1371/journal.pone.0090182.t002



**Figure 1. Meta-analysis including the studies of HERV-Fc1 association with MS published previously and those performed in the Spanish cohorts.** Forest plot showing the overall data (A) and after eliminating heterogeneity by removing the Southern Spanish cohort (B). doi:10.1371/journal.pone.0090182.g001

compared with healthy controls [28], but no additional insertions in other genomic contexts could be identified [29]. Further functional studies are warranted to elucidate the exact mechanism involved in the trigger of MS predisposition.

This new association transcends the boundaries of the identification of an additional genetic risk factor for MS, its location in a region of the genome overlooked by GWAS is highly relevant to dispatch the widely held view that a big part of the human genome constitutes mostly “junk DNA”, an issue recently illustrated by the ENCODE project [15]. The work now presented encourages the screening of unexplored sequences harbouring human endogenous retrovirus, as they could be at the crossroads of genetics and environment [30]. Some interesting results in terms of MS predisposition have been already published for HERV-W [31], HERV-H [32] and HERV-K18 [33], supporting the relevance of these endogenous retroviruses. A remaining challenge for the search of susceptibility variants in complex diseases as MS lies in populating these virgin territories by characterizing repetitive sequences of the genome.

## Materials and Methods

### Patients

Three independent cohorts including a total of 2473 MS patients and 3031 ethnically matched controls were consecutively

recruited from the following Spanish Hospitals: H. Clínico San Carlos, Madrid (883 patients and 692 controls), H. Basurto, Bilbao (569 patients and 980 controls) and from three Hospitals of Andalucía: H. Regional Universitario, Málaga; H. Virgen Macarena, Sevilla and H. Virgen de las Nieves, Granada (1021 patients and 1359 controls) (Table 1). MS Spanish patients were diagnosed based on the McDonald criteria [34].

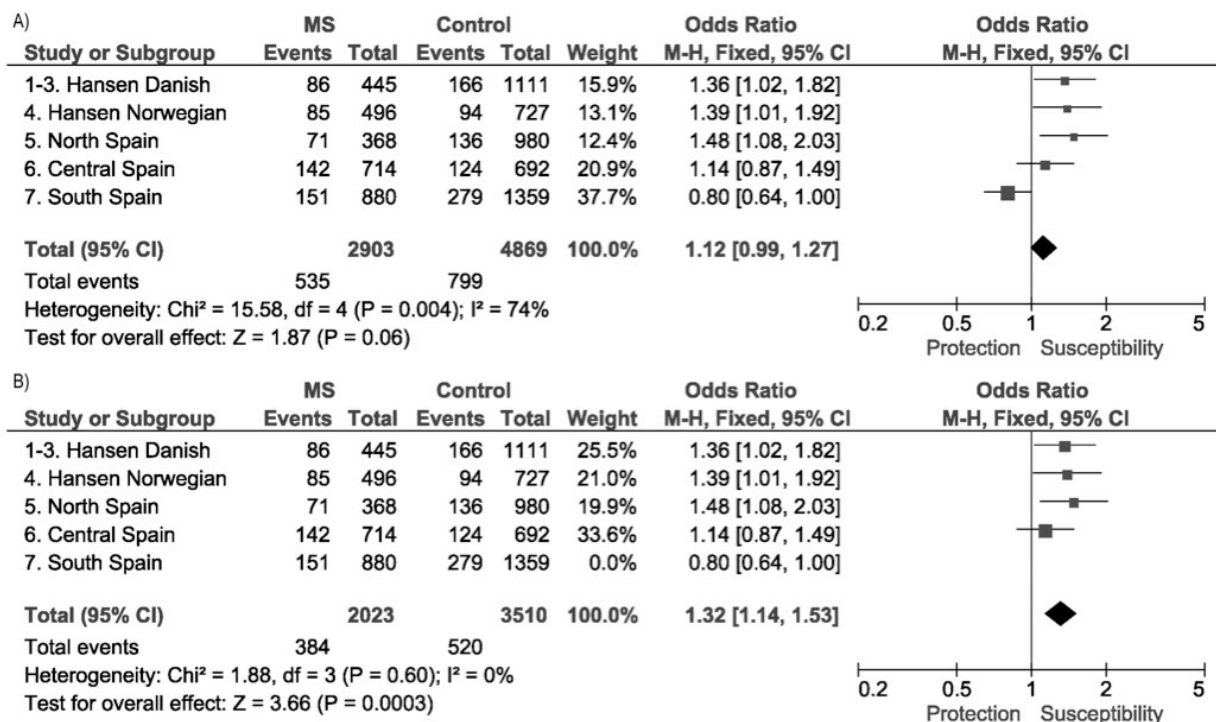
### Ethics statement

All subjects were recruited after written informed consent and the Ethics Committees of the participant hospitals approved this study: CEIC (Ethics Committee of Clinical Investigation) from H. Basurto (Bilbao), CEIC from H. Clínico San Carlos (Madrid), CEIC from H. Regional Universitario (Málaga), CEIC from H. Virgen Macarena (Sevilla), CEIC from C.S.I.C. and CEIC from H. Virgen de las Nieves (Granada). All research was conducted according to the principles expressed in the Declaration of Helsinki.

### Genotyping

DNA was extracted from peripheral blood by a standard salting out method. The single nucleotide polymorphism rs391745 was analyzed by Taqman technology using 384 well plates in a 7900HT Fast Real-Time PCR system, under the conditions





**Figure 2. Meta-analysis of HERV-Fc1 association studies with bout-onset MS.** Forest plot including all the available cohorts (A), and after eliminating heterogeneity by removing the Southern Spanish cohort (B).  
doi:10.1371/journal.pone.0090182.g002

recommended by the manufacturer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

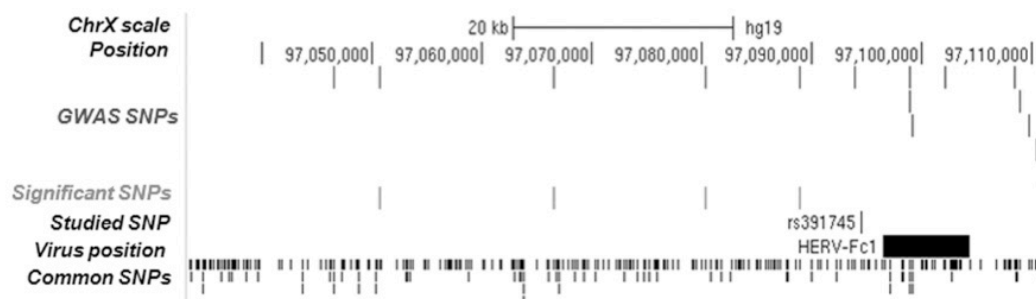
### Systematic review

We performed a comprehensive search strategy of various electronic databases: MEDLINE (1966 - October 2013), Cochrane Database of Systematic Reviews (1991- October 2013) and EMBASE (1980- October 2013), by combining the terms: "HERV-Fc1", "HERV-F" and "rs391745". Additionally, a manual search of all references was conducted among the identified studies and relevant review articles. This search rendered 20 articles published to date. Neither date nor language

restrictions were imposed. The association studies considered for further analysis were required to hold information about rs391745 genotypes and consequently only two studies remained. Non-published data from the Spanish cohorts described above were also included (see Fig. S1 and Fig. S2).

### Statistical analysis

Statistical analyses were performed with standard software (SPSS v15 and Review Manager RevMan v. 5.0.). For the Mantel-Haenszel analysis, Odds Ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated by using raw data for each study and for the pooled population. The Der Simonian and Laird



**Figure 3. Scheme of the HERV-Fc1 position and polymorphisms in the locus.** The figure depicts from top to bottom: Chr X scale; chromosomal position as indicated in B37/gh19 (Position); SNPs genotyped in the IMSCG-WTCCC2 GWAS (GWAS SNPs); statistically significant SNPs with  $p \leq 0.05$  (Significant SNPs); position of rs391745 (Studied SNP); HERV-Fc1 retrovirus copy position (Virus Position) and common polymorphisms mapping at this locus (Common SNPs).  
doi:10.1371/journal.pone.0090182.g003

random effects model was used according to the results of the tests of heterogeneity. The combined effect for heterogeneity was calculated by estimating the inverse variance,  $p$  value  $< 0.10$  and the  $I^2$  statistic with a cut-off point of 25%, which define a significant degree of heterogeneity between the studies. The effect of each study was weighted for the total number of patients included. A sensitivity analysis was performed to test the relative influence of each study on the results. Studies were sequentially dropped, and the effect on the change in the overall degree of heterogeneity was determined.

## Supporting Information

**Figure S1 Preferred reported items for systematic review and meta-analyses.** PRISMA 2009 Checklist. (TIF)

## References

1. Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006) Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354: 942–55.
2. Hutchinson M (2011) The major cause of multiple sclerosis is environmental: genetics has a minor role—commentary. *Mult Scler* 17: 1176.
3. Simpson S, Jr., Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B (2011) Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 82: 1132–41.
4. Lucas RM, Ponsonby AL, Dear K, Valery PC, Pender MP, et al. (2011) Sun exposure and vitamin D are independent risk factors for CNS demyelination. *Neurology* 76: 540–8.
5. Pierrot-Descilligny C, Souberbielle JC (2010) Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? *Brain* 133: 1869–88.
6. Ebers GC (2008) Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 7: 268–77.
7. Ascherio A, Munch M (2000) Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Epidemiology* 11: 220–4.
8. Owens GP, Bennett JL (2012) Trigger, pathogen, or bystander: the complex nexus linking Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *Mult Scler* 18: 1204–8.
9. Christensen T (2007) Human herpesviruses in MS. *Int MS J* 14: 41–7.
10. Jersild C, Svejgaard A, Fog T (1972) HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet* 1: 1240–1.
11. Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, Saarela J, Dymont DA, et al. (2005) A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet* 37: 1108–12.
12. Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, et al. (2007) Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 357: 851–62.
13. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, et al. (2011) Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476: 214–9.
14. Watson CT, Disanto G, Breiden F, Giovannoni G, Ramagopalan SV (2012) Estimating the proportion of variation in susceptibility to multiple sclerosis captured by common SNPs. *Sci Rep* 2: 770.
15. Maher B (2012) ENCODE: The human encyclopaedia. *Nature* 489: 46–8.
16. Stoye JP (2012) Studies of endogenous retroviruses reveal a continuing evolutionary saga. *Nat Rev Microbiol* 10: 395–406.
17. Barrio AM, Ekerljung M, Jern P, Benachenhou F, Sperber GO, et al. (2011) The first sequenced carnivore genome shows complex host-endogenous retrovirus relationships. *PLoS One* 6: e19832.
18. Ryan FP (2011) Human endogenous retroviruses in multiple sclerosis: potential for novel neuro-pharmacological research. *Curr Neuropharmacol* 9: 360–9.
19. Benit L, Calteau A, Heidmann T (2003) Characterization of the low-copy HERV-Fc family: evidence for recent integrations in primates of elements with coding envelope genes. *Virology* 312: 159–68.
20. Nexø BA, Christensen T, Frederiksen J, Møller-Larsen A, Oturai AB, et al. (2011) The etiology of multiple sclerosis: genetic evidence for the involvement of the human endogenous retrovirus HERV-Fc1. *PLoS One* 6: e16652.
21. Hansen B, Oturai AB, Harbo HF, Celius EG, Nissen KK, et al. (2011) Genetic association of multiple sclerosis with the marker rs391745 near the endogenous retroviral locus HERV-Fc1: analysis of disease subtypes. *PLoS One* 6: e26438.
22. Ascherio A, Munger KL, Lunemann JD (2012) The initiation and prevention of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 8: 602–12.
23. Lin PI, Vance JM, Pericak-Vance MA, Martin ER (2007) No gene is an island: the flip-flop phenomenon. *Am J Hum Genet* 80: 531–8.
24. Faraone SV, Skol AD, Tsuang DW, Bingham S, Young KA, et al. (2002) Linkage of chromosome 13q32 to schizophrenia in a large veterans affairs cooperative study sample. *Am J Med Genet* 114: 598–604.
25. Zaykin DV, Shibata K (2008) Genetic flip-flop without an accompanying change in linkage disequilibrium. *Am J Hum Genet* 82: 794–6; author reply 796–7.
26. Clarke GM, Cardon LR (2010) Aspects of observing and claiming allele flips in association studies. *Genet Epidemiol* 34: 266–74.
27. Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, et al. (2013) Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 45: 1353–60.
28. Laska MJ, Brudek T, Nissen KK, Christensen T, Møller-Larsen A, et al. (2012) Expression of HERV-Fc1, a human endogenous retrovirus, is increased in patients with active multiple sclerosis. *J Virol* 86: 3713–22.
29. Nissen KK, Laska MJ, Hansen B, Pedersen FS, Nexø BA (2012) No additional copies of HERV-Fc1 in the germ line of multiple sclerosis patients. *Virol J* 9.
30. Christensen T (2005) Association of human endogenous retroviruses with multiple sclerosis and possible interactions with herpes viruses. *Rev Med Virol* 15: 179–211.
31. Garcia-Montojo M, Dominguez-Mozo M, Arias-Leal A, Garcia-Martinez A, De las Heras V, et al. (2013) The DNA copy number of human endogenous retrovirus-W (MSRV-type) is increased in multiple sclerosis patients and is influenced by gender and disease severity. *PLoS One* 8: e53623.
32. Brudek T, Christensen T, Aagaard L, Petersen T, Hansen HJ, et al. (2009) B cells and monocytes from patients with active multiple sclerosis exhibit increased surface expression of both HERV-H Env and HERV-W Env, accompanied by increased seroreactivity. *Retrovirology* 6: 104.
33. de la Hera B, Varade J, Garcia-Montojo M, Lamas JR, de la Encarnacion A, et al. (2013) Role of the human endogenous retrovirus HERV-K18 in autoimmune disease susceptibility: study in the Spanish population and meta-analysis. *PLoS One* 8: e62090.
34. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, et al. (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50: 121–7.

**Figure S2 Preferred reported items for systematic review and meta-analyses.** PRISMA 2009 Flow Diagram. (TIF)

## Acknowledgments

We thank patients and controls for making this study feasible. Angel García and Carmen Martínez provided expert technical assistance.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KV FM EU. Performed the experiments: BDLH JV MGM MF IA. Analyzed the data: AA IA LL RAL. Contributed reagents/materials/analysis tools: OF GI AA RA. Wrote the paper: KV FM EU.



# Natalizumab-related anaphylactoid reactions in MS patients are associated with HLA class II alleles

OPEN

Belén de la Hera, MS  
Elena Urcelay, PhD  
David Brassat, MD  
Andrew Chan, MD  
Angela Vidal-Jordana, MD  
Anke Salmen, MD  
Luisa Maria Villar, MD  
José Carlos Álvarez-Cermeño, MD  
Guillermo Izquierdo, MD  
Oscar Fernández, MD  
Begoña Oliver, PhD  
Albert Saiz, MD  
Jose Ramón Ara, MD  
Ana G. Vigo, PhD  
Rafael Arroyo, MD  
Virginia Meca, MD  
Sunny Malhotra, PhD  
Nicolás Fissolo, PhD  
Alejandro Horga, MD  
Xavier Montalban, MD  
Manuel Comabella, MD

## ABSTRACT

**Objectives:** We aimed to investigate potential associations between human leukocyte antigen (HLA) class I and class II alleles and the development of anaphylactic/anaphylactoid reactions in patients with multiple sclerosis (MS) treated with natalizumab.

**Methods:** HLA class I and II genotyping was performed in patients with MS who experienced anaphylactic/anaphylactoid reactions and in patients who did not develop infusion-related allergic reactions following natalizumab administration.

**Results:** A total of 119 patients with MS from 3 different cohorts were included in the study: 54 with natalizumab-related anaphylactic/anaphylactoid reactions and 65 without allergic reactions. *HLA-DRB1\*13* and *HLA-DRB1\*14* alleles were significantly increased in patients who developed anaphylactic/anaphylactoid reactions ( $p_{M-H} = 3 \times 10^{-7}$ ; odds ratio [OR]<sub>M-H</sub> = 8.96, 95% confidence interval [CI] = 3.40–23.64), with a positive predictive value (PPV) of 82%. In contrast, the *HLA-DRB1\*15* allele was significantly more represented in patients who did not develop anaphylactic/anaphylactoid reactions to natalizumab ( $p_{M-H} = 6 \times 10^{-4}$ ; OR<sub>M-H</sub> = 0.2, 95% CI = 0.08–0.50), with a PPV of 81%.

**Conclusions:** HLA-DRB1 genotyping before natalizumab treatment may help neurologists to identify patients with MS at risk for developing serious systemic hypersensitivity reactions associated with natalizumab administration. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2014;1:e47; doi: 10.1212/NXI.0000000000000047

## GLOSSARY

CI = confidence interval; HLA = human leukocyte antigen; MS = multiple sclerosis; NPV = negative predictive value; OR = odds ratio; PPV = positive predictive value.

Similar to other biological agents, natalizumab, a highly effective therapy for multiple sclerosis (MS), can induce infusion-related hypersensitivity reactions. These reactions typically occur within 2 hours after infusion, with a peak at the second infusion, and range from urticaria, allergic dermatitis, and hives to more serious anaphylactic/anaphylactoid reactions in which treatment should be discontinued.<sup>1</sup> The incidence of systemic hypersensitivity reactions classified as anaphylactoid or anaphylactic was reported to be 0.8% in the AFFIRM trial<sup>2</sup> and ranged between 1.0% and 3.8% in more recent observational studies.<sup>3–6</sup>

An important number of drug hypersensitivity reactions are known to be mediated through interactions with human leukocyte antigen (HLA) molecules encoded within the major histocompatibility complex.<sup>7</sup> Based on this, in the present study we investigated whether the

Correspondence to  
Dr. Comabella:  
manuel.comabella@vhir.org

See editorial

Supplemental data  
at [Neurology.org/nn](http://Neurology.org/nn)

From the Department of Immunology (B.d.l.H., E.U., A.G.V.) and Department of Neurology, Multiple Sclerosis Unit (R.A.), Hospital Clínico San Carlos (IdISSC), Madrid, Spain; Pole des neurosciences et INSERM U1043 (D.B.), Université de Toulouse III, Hôpital Purpan, Toulouse, France; Department of Neurology (A.C., A. Salmen), St. Josef-Hospital, Ruhr University, Bochum, Germany; Servei de Neurologia-Neuroimmunologia (A.V.-J., S.M., N.F., A.H., X.M., M.C.), Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat), Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR), Hospital Universitari Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; Departments of Neurology and Immunology (L.M.V., J.C.A.-C.), Hospital Universitario Ramón y Cajal, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria, Madrid, Spain; Hospital Universitario Virgen Macarena (G.I.), Seville, Spain; Unidad de Gestión Clínica de Neurociencias (O.F., B.O.), Instituto de Biomedicina de Málaga (IBIMA), Hospital Universitario Regional de Málaga, Universidad de Málaga, Spain; Service of Neurology (A. Saiz), Hospital Clínic, Universitat de Barcelona and Institut d'Investigació Biomèdica August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona, Spain; Department of Biochemistry, Molecular and Cellular Biology (J.R.A.), Science Faculty, University of Zaragoza, Spain; and Fundación de Investigación Biomédica (V.M.), Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, Spain.

Go to [Neurology.org/nn](http://Neurology.org/nn) for full disclosures. Funding information and disclosures deemed relevant by the authors, if any, are provided at the end of the article. The Article Processing Charge was paid by the authors.

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Noncommercial No Derivative 3.0 License, which permits downloading and sharing the work provided it is properly cited. The work cannot be changed in any way or used commercially.



development of anaphylactic/anaphylactoid reactions in patients with MS treated with natalizumab was associated with particular HLA class I and class II alleles.

**METHODS Patients and HLA typing.** Inclusion criteria were patients with MS treated with natalizumab who developed anaphylactic/anaphylactoid reactions within 2 hours after infusion between the second and eleventh administrations of natalizumab, which motivated natalizumab suspension. Patients fulfilled the clinical criteria for the diagnosis of anaphylaxis promulgated in the World Allergy Organization anaphylaxis guidelines.<sup>8</sup> Patients with MS who did not develop anaphylactic/anaphylactoid reactions during natalizumab infusions were used as controls.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples using standard methods. HLA genotyping was performed by means of the PCR-SSOP Luminex method using Lifecodes *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-DRB1*, and *HLA-DQB1* typing kits (Immucor Gamma Transplant Diagnostics, Inc., Heppignies, Belgium) according to the manufacturer's instructions.

**Statistical analysis.** Statistical analysis was performed by using the SPSS 17.0 package (SPSS Inc., Chicago, IL). Comparisons of groups were analyzed using the  $\chi^2$  test of a Fisher exact test (when expected values were below 5). To calculate combined odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs), we used the Cochran-Mantel-Haenszel method implemented in Review Manager RevMan v. 5.0 (The Nordic Cochrane Centre, Copenhagen, Denmark). *p* values <0.05 were considered statistically significant. The Der Simonian and Laird random effects model was used according to the results of the tests of heterogeneity. A sensitivity analysis was performed to test the relative influence of each study on the results. Studies were sequentially dropped, and the effect on the change in the overall degree of heterogeneity was determined.

**Standard protocol approvals, registrations, and patient consents.** The study was approved by the corresponding local ethics committees, and all patients gave their informed consent.

**RESULTS** A total of 119 patients with MS belonging to 3 different cohorts (French, *n* = 63; Spanish, *n* = 48;

German, *n* = 8) were included in the study. A summary of demographic and main clinical characteristics of patients with MS who participated in the study is shown in table 1. Information on anti-natalizumab antibodies was available for 27 (50%) of the 54 patients with MS who developed infusion-related anaphylactic/anaphylactoid reactions, and 22 patients (81.5%) were positive for anti-natalizumab antibodies.

Tables e-1, e-2, and e-3 summarize the distribution of HLA alleles in all the patients with MS included in the study. The frequency of carriers of the *HLA-DRB1\*13* and *HLA-DRB1\*14* alleles (the latter in almost complete linkage disequilibrium with *HLA-DQB1\*05:03*) was significantly increased in patients who experienced anaphylactoid reactions compared to patients who did not develop drug-related allergic reactions (28/54 [52.0%] vs 6/65 [10.5%];  $p_{M-H} = 3 \times 10^{-7}$ ;  $OR_{M-H}$  [95% CI] = 8.96 [3.40–23.64]) (figure). In contrast, as depicted in the figure, the frequency of carriers of the *HLA-DRB1\*15* allele (in almost complete linkage disequilibrium with *HLA-DQB1\*06:02*) was significantly increased in the group of patients without allergic reactions to natalizumab compared to patients who developed anaphylactoid reactions (7/54 [13.0%] vs 29/65 [44.8%];  $p_{M-H} = 6 \times 10^{-4}$ ;  $OR_{M-H}$  [95% CI] = 0.2 [0.08–0.50]). In the European population, the frequencies of the *HLA-DRB1\*15* and *HLA-DRB1\*13\*14* alleles are 14% each.

Most probably these risk and protective HLA class II alleles conformed ancestral haplotypes with class I alleles, since the *HLA-DRB1\*13* and *HLA-DRB1\*14* alleles were frequently accompanied by *HLA-A\*24*, and the *HLA-DRB1\*15* allele by *HLA-A\*03* or *HLA-B\*07* (see tables e-2 and e-3). Nonetheless, the HLA class II alleles remained the best associated markers of

**Table 1** Summary of demographic and baseline clinical characteristics of patients with MS treated with natalizumab included in the study

Characteristics	France		Spain		Germany	
	AR	No AR	AR	No AR	AR	No AR
N	33	30	16	32	5	3
Age, y <sup>a</sup>	35.8 (6.3)	37.5 (9.0)	35.8 (8.3)	38.1 (7.1)	33.4 (4.8)	37.7 (8.7)
Female/male (% women)	30/3 (90.9)	21/9 (70.0)	12/4 (75.0)	23/9 (71.9)	4/1 (80.0)	2/1 (66.7)
Duration of disease, y <sup>a</sup>	8.9 (7.0)	10.2 (6.2)	8.7 (2.6)	11.7 (6.7)	7.8 (3.2)	6.7 (4.5)
EDSS score <sup>b</sup>	3.1 (1.5–4.0)	3.8 (3.0–5.0)	3.3 (2.0–4.4)	3.3 (2.0–4.0)	2.0 (1.5–2.5)	2.5 (2.0–3.0)
No. of relapses <sup>c</sup>	2.0 (1.0)	2.2 (1.0)	1.7 (0.9)	1.5 (1.0)	4.5 (0.7)	2.5 (2.1)

Abbreviations: AR = anaphylactic/anaphylactoid reaction; EDSS = Expanded Disability Status Scale; MS = multiple sclerosis.

Data are expressed as mean (SD) unless otherwise stated.

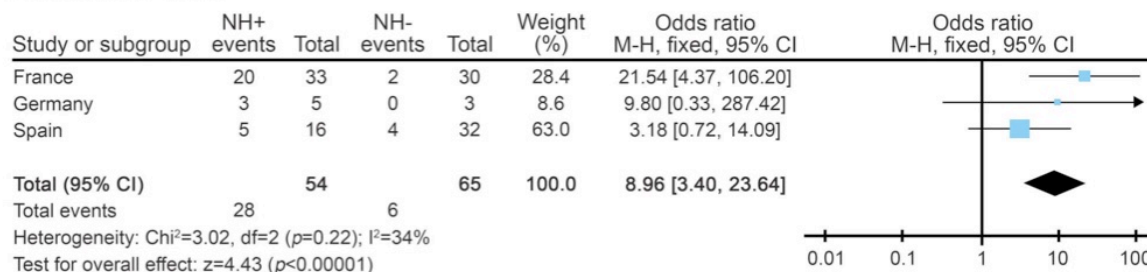
<sup>a</sup>Refers to age and disease duration at treatment onset.

<sup>b</sup>Data are expressed as mean (interquartile range).

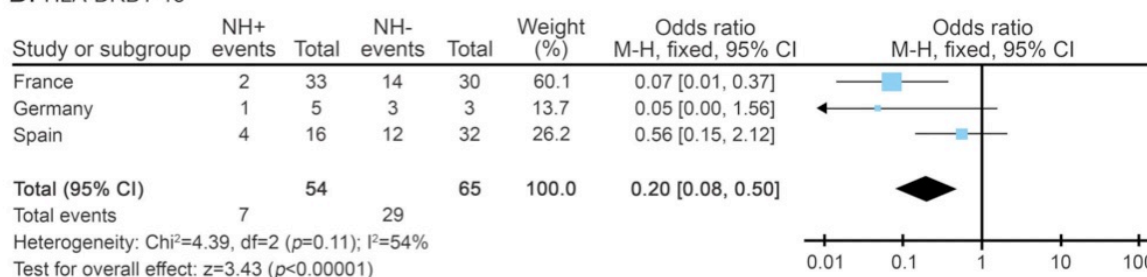
<sup>c</sup>Refers to the number of relapses in the year before treatment onset. For the Germany cohort, information on relapses and EDSS is missing in 5 and 3 patients, respectively.

**Figure** Meta-analysis showing the influence of *HLA-DRB1\*13/\*14* and *HLA-DRB1\*15* in the development of anaphylactic/anaphylactoid reactions to natalizumab in the different study cohorts

#### A. *HLA-DRB1\*13/\*14*



#### B. *HLA-DRB1\*15*



Spanish cohort excluded

Odds ratio (95% CI)

0.07 [0.02, 0.30]

Heterogeneity:  $\chi^2=0.05$ ,  $df=1$  ( $p=0.82$ );  $I^2=0\%$

Test for overall effect:  $z=3.60$  ( $p=0.0003$ )

Meta-analysis showing the influence of *HLA-DRB1\*13/\*14* (A) and *HLA-DRB1\*15* (B) in the development of anaphylactic/anaphylactoid reactions to natalizumab in the different study cohorts. Forest plots showing the overall data and data after eliminating heterogeneity by removing the Spanish cohort. CI = confidence interval; HLA = human leukocyte antigen; HN+/HN- = patients who developed and did not develop anaphylactic/anaphylactoid reactions, respectively; M-H = Mantel-Haenszel.

anaphylactic/anaphylactoid reactions to natalizumab, conferring the following positive and negative predictive values (PPV/NPV): PPV = 0.82/NPV = 0.69 for the *HLA-DRB1\*13* and *\*14*, and PPV = 0.81/NPV = 0.57 for the *HLA-DRB1\*15*.

**DISCUSSION** Two types of infusion-related hypersensitivity reactions have been described in patients with MS treated with natalizumab: type I allergic reactions, which usually occur within 2 hours after infusion,<sup>1</sup> and type III hypersensitivity reactions, which typically develop during several days.<sup>9</sup> Type I hypersensitivity reactions include serious systemic anaphylactic/anaphylactoid, with an incidence that has been reported to be near 4% in some observational studies.<sup>3,6</sup> When these hypersensitivity reactions are present, administration of natalizumab must be discontinued and patients should not be retreated.

Aiming to identify patients at risk for developing anaphylactic/anaphylactoid reactions to natalizumab, we performed HLA typing for class I and class II

alleles in patients with MS from 3 different cohorts who were treated with natalizumab. The selection of the HLA region as the main target for genotyping was based on current evidence in the literature demonstrating significant associations between HLA and predisposition to adverse drug reactions.<sup>7</sup> Drug hypersensitivity reactions are supposed to be mediated by inappropriate T-cell activation, and the key proteins implicated in these responses are the HLA molecules. Several models have been proposed to explain the mechanisms whereby small synthetic compounds are recognized by T cells in an HLA-dependent manner, including the hapten/prohapten model, the altered peptide repertoire model, and the p-i model (pharmacologic interaction of drugs with immune receptors).<sup>10</sup> Examples of drug-induced hypersensitivity reactions influenced by the HLA are the reactions to the reverse-transcriptase inhibitor abacavir and the xanthine oxidase inhibitor allopurinol, which are mediated by HLA class I alleles, and the reactions to the reverse-transcriptase inhibitor



nevirapine and the first-line anticonvulsant carbamazepine, which are mediated by both HLA class I and class II alleles.<sup>7,10</sup>

Patients with MS carrying *HLA-DRB1\*13* and *HLA-DRB1\*14* alleles were at higher risk for developing natalizumab-related anaphylactic/anaphylactoid reactions compared to patients without allergic reactions, with an OR of 9 and a PPV of 82%. On the other hand, the *HLA-DRB1\*15* allele, which is known to be the main genetic risk for MS, had a protective effect on the development of anaphylactic/anaphylactoid reactions, with an OR of 0.2 and a PPV of 81%.

Neutralizing antibodies against natalizumab are usually present in patients having type I hypersensitivity reactions.<sup>11</sup> In our study, 81% of the patients with MS who experienced anaphylactic/anaphylactoid reactions were positive for anti-natalizumab antibodies.

Based on these results, genotyping for the *HLA-DRB1* gene may be incorporated into clinical practice before initiating treatment with natalizumab to identify MS patients with increased (or decreased) risk for developing serious hypersensitivity reactions following IV administration of natalizumab. We suggest that patients with MS and *HLA-DRB1\*13* and *HLA-DRB1\*14* alleles be strictly monitored during natalizumab administration, maintaining a high index of suspicion for hypersensitivity reactions.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

B. de la Hera: HLA genotyping, manuscript revision, statistical analysis and interpretation of the data. E. Urcelay: manuscript drafting and revision, study concept and design, contribution of patients and clinical data, statistical analysis and interpretation of the data. D. Brassat: manuscript revision, contribution of patients and clinical data, analysis and interpretation of the data. A. Chan: manuscript revision, contribution of patients and clinical data, analysis and interpretation of the data. A. Vidal-Jordana: manuscript revision, contribution of patients and clinical data, analysis and interpretation of the data. A. Salmen: manuscript revision, contribution of patients and clinical data, analysis and interpretation of the data. L.M. Villar: manuscript revision, contribution of patients and clinical data, analysis and interpretation of the data. J.C. Álvarez-Cermeno: manuscript revision, contribution of patients and clinical data, analysis and interpretation of the data. G. Izquierdo: manuscript revision, contribution of patients and clinical data, analysis and interpretation of the data. O. Fernández: manuscript revision, contribution of patients and clinical data, analysis and interpretation of the data. B. Oliver: manuscript revision, contribution of patients and clinical data, analysis and interpretation of the data. A. Saiz: manuscript revision, contribution of patients and clinical data, analysis and interpretation of the data. J.R. Ara: manuscript revision, contribution of patients and clinical data, analysis and interpretation of the data. A.G. Vigo: HLA genotyping, manuscript revision, statistical analysis and interpretation of the data. R. Arroyo: manuscript revision, contribution of patients and clinical data, analysis and interpretation of the data. V. Meca: manuscript revision, contribution of patients and clinical data, analysis and interpretation of the data. S. Malhotra: manuscript drafting and revision, analysis and interpretation of the data. N. Fissolo: manuscript drafting and revision, analysis and interpretation of the data. A. Horga: manuscript revision, contribution of patients and clinical data. X. Montalban: manuscript revision, contribution of patients and clinical data, analysis and interpretation of the data. M. Comabella: manuscript drafting and revision, study concept and design, analysis and interpretation of the data, study supervision.

#### STUDY FUNDING

The "Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM)" sponsored by the FEDER-FIS, FEDER-FIS P113/0879 and the "Ajuts per donar Suport als Grups de Recerca de Catalunya," sponsored by the "Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca" (AGAUR), Generalitat de Catalunya, Spain. The study was also funded with a FP7 grant "Best MS": Best Escalation Treatment in Multiple Sclerosis (MS), Grant agreement no: 305477. French patients were included in the BIONAT cohort funded by the French Ministry of Health (Projet Hospitalier de Recherche Clinique, PHRC 2008 (grant agreement no: 2008-005906-38 and clinicaltrials.org identifier NCT00942214) and the French MS Society (ARSEP 2007, 2008, 2010).

#### DISCLOSURE

B. de la Hera and E. Urcelay report no disclosures. D. Brassat has received funding from Biogen Idec, Sanofi Genzyme, Teva, Merck Serono, Bayer, and Almirall and has received research support from French Ministry of Health, French Multiple Sclerosis Society, and European Union PF7 Marie Curie Action. A. Chan has served on the scientific advisory boards for Bayer Schering, Biogen Idec, Genzyme, Merck Serono, Novartis Pharma, Sanofi-Aventis, and Teva Neuroscience; has consulted for Bayer Schering, Biogen Idec, Genzyme, Merck Serono, Novartis, Sanofi-Aventis, and Teva Neuroscience; has received research support from Biogen Idec, Novartis Pharma, Genzyme, German Ministry for Education and Research, and Ruhr University Bochum; and was an expert consultant for Sanofi-Aventis. A. Vidal-Jordana has received speaker honoraria from Serono-Symposia, Teva, and Sanofi-Aventis and has received travel support from Novartis. A. Salmen has received speaker honoraria from Sanofi and Almirall Hermal GmbH. L.M. Villar holds a patent for a biomarker for selecting good responders to interferon- $\beta$  in MS, has been a consultant for Bayer and Biogen Idec, and received research support from Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. J.C. Álvarez-Cermeno has served on the scientific advisory boards for Biogen Idec, Novartis, Genzyme, and Roche; received speaker honoraria from Biogen Idec, Novartis, Genzyme, and Teva; and received research support from Biogen Idec, Novartis, Bayer, Merck Serono, Carlos III Institute, and Spanish Ministry of Economy. G. Izquierdo has served on the scientific advisory boards for Biogen Idec, Bayer, Sanofi, Novartis, Merck, and Teva and has consulted for Sanofi, Merck, and Novartis. O. Fernández has served on the advisory boards for Biogen Idec, Bayer Schering, Merck Serono, Teva, Novartis, Actelion, Almirall, and Allergan and has received funding from Biogen Idec, Bayer Schering, Merck Serono, Teva, Novartis, Actelion, Almirall, and Allergan. B. Oliver reports no disclosures. A. Saiz has served on the advisory boards for Biogen Idec and Merck Serono; has received funding from Bayer Schering, Merck Serono, Biogen Idec, Sanofi-Aventis, Teva Pharmaceutical Industries, and Novartis; and has consulted for Bayer Schering, Merck Serono, Biogen Idec, Sanofi-Aventis, Teva Pharmaceutical Industries, and Novartis. J.R. Ara has received research support from Merck Espana, Novartis Espana, Biogen Idec, Sanofi Espana, and Teva. A.G. Vigo reports no disclosures. R. Arroyo has served on the advisory board for Teva, Biogen, Novartis, Merck Serono, Roche, Bayer, and Almirall and has received funding from Teva, Biogen, Novartis, Merck Serono, Bayer, and Almirall. V. Meca has served on the advisory board for Roche and has received funding from Biogen Idec, Novartis, Merck, and Teva. S. Malhotra has received research support from the "Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM)" sponsored by the FIS, "Ajuts per donar Suport als Grups de Recerca de Catalunya," sponsored by the "Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca," and Marie Curie Initial Training Network "UEPHA\*MS." N. Fissolo reports no disclosures. A. Horga received research support from National Institute of Health Carlos III Spain. X. Montalban has served on the advisory boards for Novartis, Teva Pharmaceutical, Merck Serono, Biogen, Bayer Schering Pharma, GSK, Almirall, and Neurotech Pharma; has received funding from Novartis, Teva Pharmaceuticals, Merck Serono, Biogen, Bayer Schering Pharma, GSK, Almirall, and Neurotech Pharma; is on the editorial board for *MS, Journal of Neurology, The International MS Journal, Revista Neurologia*, and *Therapeutic Advances in Neurological Disorders*; has consulted for Bayer Schering Pharma, Biogen Idec, Merck Serono, Teva, Sanofi-Aventis, Novartis, Almirall, and Lilly; and has received research

support from Multiple Sclerosis Foundation of Barcelona. M. Comabella has received speaker honoraria from Bayer Schering Pharma, Merck Sorono, Biogen Idec, Teva Pharmaceuticals, Sanofi-Aventis, and Novartis; is on the editorial board for *Journal of Neuroimmunology* and *Journal of Clinical Immunology*; and has received research support from Red Española de Esclerosis Múltiple, Ajuts per donar Suport als Grups de Recerca de Catalunya, and Marie Curie Initial Training Network “UEPHA\*MS.” Go to [Neurology.org/nn](http://Neurology.org/nn) for full disclosures.

Received July 16, 2014. Accepted in final form October 13, 2014.

## REFERENCES

1. Rudick RA, Panzara MA. Natalizumab for the treatment of relapsing multiple sclerosis. *Biologics* 2008;2:189–199.
2. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006;345:899–910.
3. Oturai AB, Koch-Henriksen N, Petersen T, Jensen PE, Sellebjerg F, Sorensen PS. Efficacy of natalizumab in multiple sclerosis patients with high disease activity: a Danish nationwide study. *Eur J Neurol* 2009;16:420–423.
4. Putzki N, Yaldizli O, Mäurer M, et al. Efficacy of natalizumab in second line therapy of relapsing-remitting multiple sclerosis: results from a multi-center study in German speaking countries. *Eur J Neurol* 2010;17:31–37.
5. Putzki N, Yaldizli O, Buhler R, Schwegler G, Curtius D, Tettenborn B. Natalizumab reduces clinical and MRI activity in multiple sclerosis patients with high disease activity: results from a multicenter study in Switzerland. *Eur Neurol* 2010;63:101–106.
6. Horga A, Castillo J, Rio J, et al. An observational study of the effectiveness and safety of natalizumab in the treatment of multiple sclerosis. *Rev Neurol* 2011;52:321–330.
7. Karlin E, Phillips E. Genotyping for severe drug hypersensitivity. *Curr Allergy Asthma Rep* 2014;14:418.
8. Sampson HA, Munoz-Furlong A, Campbell RL, et al. Second symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report—Second National Institute of Allergy and Infectious Disease/Food Allergy and Anaphylaxis Network symposium. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:391–397.
9. Hellwig K, Schimrigk S, Fischer M, et al. Allergic and nonallergic delayed infusion reactions during natalizumab therapy. *Arch Neurol* 2008;65:656–658.
10. Pavlos R, Mallal S, Phillips E. HLA and pharmacogenetics of drug hypersensitivity. *Pharmacogenomics* 2012;13:1285–1306.
11. Calabresi PA, Giovannoni G, Confavreux C, et al. The incidence and significance of anti-natalizumab antibodies: results from AFFIRM and SENTINEL. *Neurology* 2007;69:1391–1403.





# Nuclear export inhibitors avert progression in preclinical models of inflammatory demyelination

Jeffery D Haines<sup>1</sup>, Olivier Herbin<sup>2</sup>, Belén de la Hera<sup>1</sup>, Oscar G Vidaurre<sup>1</sup>, Gregory A Moy<sup>1</sup>, Qingxiang Sun<sup>3</sup>, Ho Yee Joyce Fung<sup>3</sup>, Stefanie Albrecht<sup>4</sup>, Konstantina Alexandropoulos<sup>2</sup>, Dilara McCauley<sup>5</sup>, Yuh Min Chook<sup>3</sup>, Tanja Kuhlmann<sup>4</sup>, Grahame J Kidd<sup>6</sup>, Sharon Shacham<sup>5</sup> & Patrizia Casaccia<sup>1,7</sup>

Axonal damage has been associated with aberrant protein trafficking. We examined a newly characterized class of compounds that target nucleo-cytoplasmic shuttling by binding to the catalytic groove of the nuclear export protein XPO1 (also known as CRM1, chromosome region maintenance protein 1). Oral administration of reversible CRM1 inhibitors in preclinical murine models of demyelination significantly attenuated disease progression, even when started after the onset of paralysis. Clinical efficacy was associated with decreased proliferation of immune cells, characterized by nuclear accumulation of cell cycle inhibitors, and preservation of cytoskeletal integrity even in demyelinated axons. Neuroprotection was not limited to models of demyelination, but was also observed in another mouse model of axonal damage (that is, kainic acid injection) and detected in cultured neurons after knockdown of *Xpo1*, the gene encoding CRM1. A proteomic screen for target molecules revealed that CRM1 inhibitors in neurons prevented nuclear export of molecules associated with axonal damage while retaining transcription factors modulating neuroprotection.

Focal axonal damage is a pathological hallmark of neurodegenerative disorders such as Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis<sup>1,2</sup>. It is characterized by cytoskeletal disruption and impaired axonal transport, resulting in localized axonal swellings<sup>1,3</sup>. Dysregulated nucleo-cytoplasmic shuttling is one of the mechanisms hypothesized to contribute to the pathogenesis of this localized damage in several neurological disorders<sup>4–6</sup>. For this reason, we tested whether targeting nuclear transport could be considered a venue of therapeutic intervention with potentially broad implications for neurodegenerative diseases. We previously identified exportin 1 (XPO1, CRM1)-mediated nuclear export as being necessary for focal axonal damage in multiple sclerosis (MS)<sup>4</sup>. CRM1 is a member of the nuclear export family of proteins that recognizes cargoes containing leucine-rich nuclear export sequences<sup>7</sup> and transports them from the nucleus to the cytoplasm<sup>8–10</sup>. Neurotoxicity has been associated with the accumulation in the axoplasm of molecules interfering with axonal cytoskeleton such as TAU<sup>11</sup> and RNA transport such as FUS and TDP-43 (refs. 12–14), thereby triggering the onset of focal axonal damage. Alternative pathogenetic explanations have focused on the decreased nuclear localization of NRF2 (nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2), a transcription factor involved in antioxidant defense<sup>15–18</sup>. To date, however, the potential therapeutic value of targeting nucleo-cytoplasmic export has not been explored. We addressed this question by characterizing the structure and biological activity of compounds targeting the nuclear export protein CRM1.

We also examined their beneficial therapeutic role in two preclinical models of axonal damage in the context of autoimmune demyelination and in a model of neurotoxicity following kainic acid injection. Finally, using a proteomic approach, we identified nuclear retention of protein targets that have been implicated in the pathogenesis of other neurological disorders, thereby suggesting the CRM1 inhibitors as potential candidates for the development of therapeutic strategies broadly targeting neuroprotection.

## RESULTS

### CRM1 protein levels are upregulated in human MS brains

Previous data from our lab revealed aberrant localization of nuclear protein in axons characterized by focal axonal damage in the brains of individuals with MS<sup>4</sup>. An important regulator of nucleo/cytoplasmic shuttling is CRM1 (refs. 8–10). We therefore sought to define the pattern of expression of CRM1 by immunohistochemistry of leukocortical MS brain lesions. Actively demyelinating lesions were defined on the basis of the reduced immunoreactivity to antibodies specific for myelin basic protein (MBP) in both the white and gray matter, the presence of phagocytes containing MBP-positive myelin degradation products in the cytoplasm at the lesion border, and the presence of numerous foamy phagocytes expressing CD68 (Fig. 1a). In the adjacent demyelinated gray matter, numerous NeuN<sup>+</sup> neurons were present, some of them with peri-somatic neurofilament immunopositivity, which was suggestive of neuronal damage

<sup>1</sup>Department of Neuroscience, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, USA. <sup>2</sup>Division of Clinical Immunology, Department of Medicine, The Immunology Institute, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, USA. <sup>3</sup>Department of Pharmacology, University of Texas Southwestern Medical Center, Texas, USA. <sup>4</sup>Institute of Neuropathology, University Hospital Münster, Münster, Germany. <sup>5</sup>Karyopharm Therapeutics, Natick, Massachusetts, USA. <sup>6</sup>Department of Neurosciences, Cleveland Clinic, Cleveland, Ohio, USA. <sup>7</sup>Department of Genetics and Genomics, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, New York, New York, USA. Correspondence should be addressed to P.C. (patrizia.casaccia@mssm.edu).

Received 2 July 2014; accepted 22 January 2015; published online 23 February 2015; doi:10.1038/nn.3953





## DISCUSIÓN

La EM hace referencia a una enfermedad desmielinizante crónica del SNC, descrita por primera vez hace ya cerca de 150 años <sup>[227]</sup>, cuya etiopatogenia permanece sin ser completamente conocida. Esto lleva, entre otras consecuencias, a que solo dispongamos de tratamientos paliativos, convirtiéndose en una enfermedad con un pronóstico desalentador a largo plazo. La mitad de los pacientes necesita ayuda con la movilidad en los 20 años siguientes a ser diagnosticados, y el 50% desarrolla déficits cognitivos substanciales<sup>[100]</sup>. Esto, junto con el hecho de existir alrededor de 2.3 millones de personas en el mundo afectadas por esta enfermedad<sup>[8]</sup>, y dado que la incidencia parece haber incrementado en los últimos tiempos<sup>[8, 9]</sup> (algunos estudios atribuyen al aumento de la enfermedad observado en las mujeres en los últimos años), sitúan a la EM como de gran interés científico. La genética de las enfermedades autoinmunes ha sufrido un gran avance en los últimos años gracias al desarrollo de los estudios de asociación del genoma GWAS, que surgían como herramienta clave para la identificación de nuevos polimorfismos de susceptibilidad implicados en el desarrollo de enfermedades autoinmunes, y que en el caso de la EM han logrado identificar alrededor de 110 SNPs; sin embargo, estos loci solo logran explicar alrededor de un 28% de la heredabilidad de la EM<sup>[103]</sup>, por lo que aún quedan muchos avances por realizar.

Parte de nuestros estudios se han centrado en ayudar a dilucidar parte de esa “heredabilidad perdida”, centrándonos en el estudio genómico de los HERVs, regiones del genoma que han quedado fuera del alcance de estos estudios por su naturaleza repetitiva, pero cuyos productos de expresión han sido relacionados con la etiología de la enfermedad. Si bien se desconoce si actúan como posible causa desencadenante o moduladora del proceso inflamatorio subyacente a la EM o bien son consecuencia de la patología. Una de las complicaciones de estos estudios se debe a que al ser regiones repetitivas del genoma, es necesaria una amplificación previa a la hibridación para poder caracterizar de forma correcta estas secuencias.

Con respecto a la familia de HERVs más relacionada con la EM, HERV-W, hemos querido ayudar a esclarecer el origen genómico de las proteínas de tipo MSRV que han sido propuestas como cofactores patogénicos de la EM. Dentro de la familia HERV-W, sólo el gen *env* situado en el Cr7 posee un ORF completo y ha sido selectivamente conservado<sup>[184]</sup>. Dicho locus codifica para la fisiológica Sincitina, que juega un papel esencial en el proceso de placentación<sup>[126]</sup>. Pero existe otra proteína Env de la misma familia, llamada Env de tipo MSRV debido a su relación con la enfermedad, que se ha visto expresada en macrófagos y células microgliales en las placas de desmielinización activa en cerebros de EM<sup>[173]</sup>, y se ha detectado en muestras de sangre periférica de los pacientes, tanto en forma de proteína soluble en suero, como de proteína asociada a membrana en la superficie de monocitos circulantes o de células B, y en menor cantidad en la superficie de células NK<sup>[150]</sup>. Se trata del único ejemplo de HERV-

W expresado como partículas virales<sup>[228]</sup>, y se diferencia de la sincitina en una inserción de 12nt<sup>[203]</sup>. Se han estudiado *in vitro* los posibles mecanismos de acción patogénicos de MSRV, y se ha visto que en la línea celular HCMEC/D3, un modelo humano de BHE, Env de tipo MSRV induce una sobre-expresión de ICAM1 de manera dosis dependiente, así como una producción de IL-6 e IL-8, mientras que la proteína Env proveniente de la sincitina no mostraba esos efectos<sup>[228]</sup>. Además, también comprobaron que la presencia de Env de tipo MSRV en un cultivo de células endoteliales cerebrales estimulaba significativamente la adhesión y trans migración de células inmunes activadas a través de la monocapa de células endoteliales<sup>[228]</sup>. La utilización de un anticuerpo monoclonal humanizado anti-Env-SU MSRV/HERV-W<sup>[190-193]</sup>, GNBAC1, ha mostrado buenos resultados en un ensayo clínico de fase IIa<sup>[192]</sup>, bloqueando la transcripción de genes pro-inflamatorios mediada por ENV, previniendo la formación de nitrotirosina, y restaurando la diferenciación de células precursoras de oligodendrocitos; estos datos apoyan la hipótesis de que MSRV pueda estar involucrado en la patogénesis de la EM, o al menos en el mantenimiento de las condiciones inflamatorias subyacentes<sup>[228]</sup>. Sin embargo, el origen de MSRV está aún por descubrir. Algunos estudios apuntan a la copia situada en el CrX como candidato plausible<sup>[207, 208]</sup> ya que posee un gen *env* de tipo MSRV completo interrumpido únicamente por un codon stop, que podría dar origen a una proteína truncada en su extremo N-terminal con potenciales propiedades fisiopatológicas; mientras que otros apoyan la hipótesis de que pueda provenir de recombinaciones entre distintos loci<sup>[207, 208]</sup>. Con la idea de clarificar su origen, realizamos una comparación de homología utilizando la secuencia descrita de *env* de HERV-W (AF331500), que mostró la existencia de 261 posibles localizaciones de *env* del tipo MSRV. De las 9 localizaciones que poseían un ORF que incorporaba tanto la sonda de MSRV como los primers descritos para detectar *env* del tipo MSRV<sup>[203]</sup>, se eligieron las 2 que presentaban ORFs de un tamaño similar al de la sincitina (1617pb), tan solo un 10% más pequeñas, y que podrían originar proteínas funcionales. Dichas copias tienen longitud de 1425 y 1416pb respectivamente, y se encuentran situadas en la posición Xq22.3 y en el Cr20. En el caso de la copia localizada en el CrX, el locus presenta un codon stop (TGA) en posición 39, pero también se observa un codon de inicio de la transcripción (ATG) en la posición 68, dando lugar a proteína Env truncada de 475 aminoácidos. Mientras que la copia situada en el Cr20 conserva un gen *env* que guarda una homología del 88% con *env* MSRV, pudiendo dar lugar a una proteína Env de 472 aminoácidos. De manera general y en concordancia con los estudios anteriores, se observaron unos niveles incrementados de transcritos de MSRV en pacientes EM comparados con controles, correlacionando con la severidad clínica de los pacientes, lo que apoya el papel de este elemento en la patología de la EM. Además, también se observó una expresión específica procedente de ambas copias en las muestras tanto de enfermos de EM como de controles, por lo que dichas copias fueron específicamente amplificadas y analizadas a través de curvas de *melting* usando parejas de primers solapantes.

En el caso de la copia situada en Xq22.3, se identificaron 3 SNPs: rs6622139 (T/C), rs6622140 (G/A) y rs1290413 (G/A). Los dos primeros están situados en la región *env* de HERV-W y

muestran un perfecto desequilibrio de ligamiento entre ellos ( $r^2=1$ ). Ambos provocan un cambio en la secuencia de aa, causando el cambio de un aa polar por uno apolar o viceversa, lo que podría causar un cambio estructural de la proteína y alterar la accesibilidad de los epítomos a las células inmunes. En cuanto a la expresión, rs6622139\*T se asoció con una mayor expresión de MRSV (U-Mann-Whitney;  $p=0.003$ ).

El estudio caso-control con un total de 1669 pacientes y 1458 controles, mostró una asociación significativa del SNP rs6622139 (T/C) con una menor susceptibilidad a desarrollar EM [ $(\chi^2)$ ;  $p=0.004$ ;  $OR(95\%CI)=0.50(0.31-0.91)$ ], y con la severidad de la enfermedad, ya que las mujeres portadoras del genotipo CC presentaron puntuaciones MSSS significativamente menores que las portadoras del genotipo CT (U-Mann-Whitney;  $p=0.039$ ) o que las pacientes portadoras del genotipo TT (U-Mann-Whitney;  $p=0.031$ ). Esta variante proteica podría ser la causa de la potente activación de la inmunidad innata y la consecuente liberación de citocinas pro-inflamatorias y gliotoxicidad que se atribuye a la proteína Env de tipo MSRV.

Con respecto al locus HERV-W situado en el Cr20, identificamos 2 SNPs [rs974293065 (T/C) y rs974293066 (T/G)], pero ni el estudio caso-control ni el estudio de expresión mostraron diferencias significativas entre enfermos y pacientes. Por lo referente a la familia HERV-W y su asociación con la EM, nuestros resultados apoyan la idea de que la copia del tipo *env* MSRV situada en el locus Xq22.3 podría tener papel en la patogénesis de la EM, mientras que descartamos el cromosoma 20 como origen genómico de Env MSRV.

La familia de HERV-K es otra de las familias de HERVs que se ha relacionado con distintas enfermedades autoinmunes como EM<sup>[138]</sup>, la diabetes tipo 1<sup>[186]</sup>, o la artritis reumatoide juvenil<sup>[134]</sup>, así como con distintos tipos de cáncer<sup>[127-130]</sup>. Su expresión es inducida tanto por Herpesvirus<sup>[214, 215]</sup> como por virus Epstein-Barr<sup>[213, 216, 220, 221]</sup>, ambos virus propuestos como factores ambientales potenciales implicados en el desarrollo de la EM<sup>[143, 147-149, 214, 217, 218, 229, 230]</sup>. Se han descrito 3 variantes distintas de la copia de HERV-K18 situada en el cromosoma 1<sup>[138]</sup>, en el primer intrón de CD48, que pueden ser definidas a través del uso de dos SNPs (18.1 SNP1\*A/SNP2\*A, 18.2 SNP1\*G/SNP2\*G, 18.3 SNP1\*A/SNP2\*G). Todas las variantes codifican para una proteína Env que posee propiedades superantigénicas. Sin embargo, solo una de las variantes (18.3) ha sido asociada previamente con una mayor susceptibilidad al desarrollo de la EM. Nosotros nos propusimos estudiar el papel de HERV-K18 en la susceptibilidad al desarrollo de las enfermedades autoinmunes. Llevamos a cabo el genotipado de HERV-K18 en nuestra cohorte, previa amplificación específica de las muestras, y la realización de un meta-análisis con los datos previamente publicados llegando a incluir un total de 2656 pacientes de EM, AR y DT1, y 2016 controles. Corroboramos la asociación del gen *env* de HERV-K18 con la susceptibilidad a desarrollar EM en nuestra cohorte, al encontrar diferencias significativas para los dos SNPs cuando estratificamos nuestra cohorte por el principal factor de susceptibilidad *HLA-DRB1\*15:01* (EM 1501+ vs Controles: GG vs AG+AA:  $p=0.02$ ,  $OR = 1.50$  y  $p=0.001$ ,  $OR=1.60$ , para los SNP1 y SNP2 respectivamente).

De igual modo, dichos SNPs también fueron tipados en una cohorte española de AR y los datos incluidos en el meta-análisis. A través de dicho estudio, corroboramos la relación de HERV-K18 con la predisposición al desarrollo de enfermedades autoinmunes en general, delimitando esta asociación al haplotipo HERV-K18.3 [97Y-154WStop; SNP1\*A-SNP2\*G:  $p=0.0008$ ; OR (95% CI) = 1.22 (1.09-1.38)], y observamos mayor homogeneidad entre las cohortes estudiadas (la  $I^2$  disminuye del 19% al 11%) cuando estratificamos dichas cohortes españolas por sus respectivos factores de susceptibilidad (el *HLA-DRB1\*15:01* para la EM, y el epítipo compartido en el caso de AR).

La expresión de HERV-K18 podría ser el mecanismo que explique la asociación de HHV-6 y VEB con enfermedades del SNC como la EM. Una persona portadora del haplotipo de susceptibilidad HERV-K18.3 podría tener una mayor predisposición al desarrollo de la EM que los portadores del haplotipo 18.1 u 18.2, al verse afectadas por desencadenantes ambientales que activen la expresión de HERV-K18 como el VEB o HHV6, o el tratamiento con IFN $\alpha$ . La expresión del superantígeno de HERV-K18, como hemos dicho antes, conduciría a una activación predominante de células T portadoras del receptor V $\beta$ 13, provocando una respuesta inmune exagerada. Dependiendo del tipo de agente ambiental, las células donde tendría lugar dicha expresión de HERV-K18 pueden variar, desencadenando los mecanismos patogénicos subyacentes a distintas enfermedades autoinmunes. Por ejemplo, se puede observar una activación de la expresión de HERV-K18 en linfocitos B en el caso de una infección por VEB<sup>[213, 216]</sup>, o una expresión sobreexpresada en PBMCs, monocitos o CPAs del cerebro en el caso de HHV-6B.

Se estudió también una tercera familia de HERVs relacionada con la EM, denominada HERV-Fc, ya que se habían encontrado niveles significativamente aumentados de ARN de un componente de esta familia situado en el CrX, HERV-Fc1, en el plasma de pacientes con EM activa, con respecto a pacientes de EM no activa o frente a controles<sup>[181]</sup>. También un SNP (rs391745) situado en una región cercana a dicho locus retroviral había sido relacionado con una mayor susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad<sup>[139, 140]</sup>. Con el objetivo de validar el efecto de susceptibilidad de HERV-Fc1 previamente observado en poblaciones del Norte de Europa, genotipamos dicho SNP en nuestra población (*Central Spain*) y en dos poblaciones adicionales provenientes del Norte y del Sur de España, llegando a tener un total de 2473 pacientes de EM, y 3031 controles; y realizamos un meta-análisis con los datos previamente publicados. Observamos que en dos de las tres cohortes analizadas existían diferencias significativas [rs391745\*C: Norte  $p=0.02$ , OR (95% CI) = 1.39 (1.04-1.85); Sur  $p=0.02$ , OR (95% CI) = 0.77 (0.62-0.96)]. Sin embargo, la cohorte del Sur de España mostraba un efecto opuesto al resto de cohortes. Esta situación, que se ha denominado efecto “flip-flop”, no es infrecuente en los estudios de asociación. Si hacemos una búsqueda bibliográfica, el artículo que hace referencia a dicho fenómeno<sup>[231]</sup> aparece citado en un mínimo de 343 artículos, y señala que esto puede indicar efectos heterogéneos de la misma variante debido a diferencias en el componente genético o en el ambiente. Una vez excluida dicha cohorte del meta-análisis,



consiguiendo así eliminar cualquier tipo de heterogeneidad entre el resto de las cohortes, observamos una relación significativa entre los portadores del alelo C del rs391754 y la susceptibilidad a desarrollar EM [rs391745\*C:  $p_{M-H}=0.0005$ ;  $OR_{M-H}(95\%CI)=1.27(1.11-1.45)$ ]. Si además estratificamos según las distintas formas clínicas, distinguiendo entre formas PP y formas no PP, se ve una ligera mejoría en la asociación al restringir el análisis a las formas no PP [ $p_{M-H}=0.0003$ ;  $OR_{M-H}(95\%CI)=1.32(1.14-1.53)$ ]. Por tanto, a través de nuestros estudios hemos corroborado la asociación del rs391745 con la EM, observada originalmente en una cohorte danesa<sup>[139]</sup> y replicada después en otra noruega<sup>[140]</sup>, descartando que este sea un locus de susceptibilidad exclusivo de zonas con alta prevalencia de la EM. Además se especificó que esta asociación se observaba en las formas no PP pero no en las PP<sup>[140]</sup>.

Así pues, aunque aún son muchos los aspectos de la etiología de la EM que quedan por resolver, nuestro trabajo apoya la relevancia que puedan tener los HERVs en la etiopatogenia de las enfermedades autoinmunes, contribuyendo bien al inicio, bien al desarrollo de la enfermedad. En concreto corroboramos el papel de estos tres componentes (MSRV, HERV-K18 y HERV-Fc1) pertenecientes a tres familias distintas de HERVs (HERV-W, HERV-K y HERV-Fc, respectivamente) dotando a los individuos portadores de alelos específicos de una mayor susceptibilidad de desarrollar EM, participando presumiblemente en una activación exacerbada del sistema inmune. Los SNPs analizados, en concordancia con el resto de SNPs relacionados con la EM a excepción del *HLA-DRB1\*15:01*, muestran un efecto modesto resaltando la compleja etiología de la enfermedad.

Al igual que la genética, los tratamientos frente a la EM también han sufrido un gran avance en las últimas décadas, desde que empezaran a utilizarse a mediados de los años noventa el IFN $\beta$  y el acetato de glatirámico, hasta la actualidad. Sin embargo, todas estas terapias dirigidas a tratar la sintomatología, como las terapias modificadoras del curso de la enfermedad, entre las que se encuentran los tratamientos inmunomoduladores [IFNbeta-1a (Rebif® y Avonex®), IFNbeta-1b (Betaferon®), Acetato de Glatirámico (Copaxone®)] y los inmunosupresores [Natalizumab (Tysabri®), Mitoxantrona (Novantrone®), Fingolimod (Gilenya®), Azatioprina (Imurel®), Teriflunomida (Aubagio®), Alemtuzumab (Lemtrada®)], consiguen en el mejor de los casos paliar los síntomas y prevenir o retrasar la progresión de la enfermedad reduciendo el número de brotes o la gravedad de los mismos, pero son tratamientos paliativos más que curativos. Además, los tratamientos de los que disponemos hoy en día están dirigidos frente a la forma RR de la EM, mientras que no son efectivos en el caso de las formas EM PP. Por lo que es un campo en el que aún quedan muchos avances por realizar y donde también hemos querido involucrarnos. Por un lado pensamos que sería de gran utilidad a la hora de elegir el mejor tratamiento para cada uno de los pacientes, la identificación de marcadores de riesgo que puedan indicarnos una mayor predisposición al desarrollo de reacciones anafilácticas frente al tratamiento con Natalizumab; y por otro a través de la colaboración en un estudio cuyo objetivo se centró en la identificación de nuevos tratamientos potenciales frente a la EM a través de la inhibición de CRM1.

El Natalizumab es un anticuerpo humanizado recombinante anti- $\alpha 4$ -integrina, indicado como tratamiento de segunda línea para pacientes de EM RR donde los medicamentos de primera línea (IFNbeta y AG) no han mostrado efectividad, o para pacientes que debutan con una forma RR muy activa, con el objetivo de disminuir la frecuencia de los brotes y enlentecer la discapacidad<sup>[232]</sup>. Generalmente es bien tolerado, y los pacientes muestran una mejora en su calidad de vida, ya que ha mostrado ser eficaz tanto a corto como a largo plazo en términos de reducción del número de brotes, prevención de la progresión de la discapacidad, y reducción de la actividad detectable por resonancia magnética<sup>[68]</sup>. El mayor riesgo que presenta es el desarrollo de una LMP, y sumados a este riesgo, los efectos adversos más graves que pueden presentar los pacientes una vez iniciado el tratamiento son las infecciones y el desarrollo de hipersensibilidad<sup>[68]</sup>. Dichas reacciones, aunque no son muy frecuentes, pueden llegar a ser muy graves y necesitar medidas de soporte vital. A pesar de que los pacientes tienen un mayor riesgo de mostrar dichas reacciones durante las primeras perfusiones o en el transcurso de las 2h horas siguientes, la Agencia Europea de Medicamentos señala que debe considerarse este riesgo en cada una de las perfusiones. Por tanto, los pacientes deben ser observados durante el transcurso de la perfusión y durante la hora posterior a la administración, debiendo suspender el tratamiento en todos aquellos que hayan mostrado una reacción de hipersensibilidad<sup>[64]</sup>.

Las moléculas HLA son las responsables de la presentación de péptidos a las células T, y se han relacionado con un importante número de reacciones de hipersensibilización a drogas<sup>[233]</sup>. Para explicar estas reacciones mediadas por células T de manera HLA dependiente se han propuesto varios modelos que incluyen la hipótesis del hapteno/prohapteno: el medicamento o su metabolito activo es capaz de unirse covalentemente a las proteínas del hospedador jugando un papel importante en la inmunogenicidad y antigenicidad. Asimismo, puede ser que el medicamento se una directamente de forma no covalente al TCR o a la proteína MHC y que provoquen la activación de células T sin la presencia de un péptido<sup>[233]</sup>.

A través de nuestros estudios hemos querido comprobar si existe algún tipo de asociación entre los alelos HLA de clase I y clase II y el desarrollo de reacciones de hipersensibilidad tras el tratamiento con Natalizumab. Tras el genotipado HLA de un total de 119 pacientes tratados con Natalizumab provenientes de tres cohortes distintas procedentes de España (n=48), Francia (n=63) y Alemania (n=8); observamos que existe una frecuencia significativamente mayor de pacientes portadores de los alelos *HLA-DRB1\*13* y *HLA-DRB1\*14* (este último en casi completo desequilibrio de ligamiento con *HLA-DQB1\*05:03*) en el grupo de pacientes que desarrollaron reacciones anafilácticas tras el tratamiento, frente a los que no mostraron signos de hipersensibilidad [28/54 (52.0%) frente a 6/65 (10.5%);  $p_{MH}=3 \times 10^{-7}$ ;  $OR_{MH}(95\%CI)=8.96$  (3.40-23.64)], con un valor predictivo positivo (PPV) del 82%. Por el contrario, también se encontró que la frecuencia del alelo *HLA-DRB1\*15* (en casi completo desequilibrio de ligamiento con el alelo *HLA-DQB1\*06:02*) estaba aumentada en el

grupo de pacientes que no mostró hipersensibilidad [7/54 (13.0%) vs 29/65 (44.8%);  $p_{M-H}=6\times 10^{-4}$ ;  $OR_{M-H}$  (95% CI)=0.2 (0.08–0.50)], con un PPV del 81%.

Nuestros datos apuntan que el genotipado HLA del paciente previo a la administración del Natalizumab puede ser de gran utilidad para identificar a los pacientes que posean un mayor o menor riesgo al desarrollo de reacciones de hipersensibilidad frente a la administración del tratamiento. Así se podría evitar así uno de los efectos adversos que se han ligado a dicho medicamento y que pueden llegar a ser muy graves, además de suponer el fracaso del tratamiento.

El daño axonal es una marca patológica característica de las enfermedades neurodegenerativas. En muchas de ellas también se ha descrito una exportación nuclear aberrante, como en la enfermedad de Alzheimer<sup>[234]</sup>, la esclerosis lateral amiotrófica<sup>[235]</sup> o la EM<sup>[54]</sup>. El objetivo del estudio fue probar la eficacia de un grupo de compuestos farmacológicos dirigidos a inhibir la proteína transportadora núcleo-citoplasma CRM1, llamados KPT276 y KPT350, como una nueva forma de intervención terapéutica en la EM. Si la desregulación de CRM1 era uno de los mecanismos conducentes al daño axonal, una nueva intervención terapéutica podría tener como objetivo la inhibición de dicha proteína, impidiendo así la acumulación patológica de proteínas nucleares como la HDAC-1 en el citoplasma. Dichos compuestos, que pertenecen al grupo de inhibidores selectivos de la exportación nuclear (SINE), están definidos estructuralmente por un grupo difluoroazetidinapropenonil, y se unen al residuo de cisteína reactivo de la hendidura catalítica de CRM1, provocando que HDAC-1 no se transporte al citoplasma y continúe siendo funcional en el núcleo. Hemos comprobado que esta unión es reversible y que ninguno de los dos compuestos mostró toxicidad en ninguno de los modelos animales utilizados, ya que no se observaron cambios significativos ni en el peso ni en el índice de masa corporal, ni provocó un aumento de la mortalidad entre los animales tratados frente al grupo control tratado solo con los excipientes (grupo vehículo). Sin embargo, sí que mostró efectos terapéuticos potenciales, ya que atenuó significativamente la progresión de la enfermedad en modelos pre-clínicos murinos de desmielinización inflamatoria (fue testado en un modelo EAE y en un modelo de EAE localizado conseguido a través de la inyección directa en la médula espinal de una solución con TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ), incluso cuando se empezó el tratamiento tras el inicio de la parálisis. Además, no solo mostró efectos neuroprotectores en los modelos animales de desmielinización causada por inflamación, sino que también actúan como agentes neuroprotectores previniendo el daño axonal inducido por excitotoxicidad, observado en modelos de daño axonal independiente de inflamación provocados por la inyección de ácido Kaínico (KA). Parece ser que su eficacia clínica se encuentra asociada, por un lado, a un efecto inmunomodulador provocando una disminución de la proliferación de las células inmunes, ya que se ha observado que favorece la acumulación nuclear de inhibidores del ciclo celular como p27; y, por otro lado, a través de la preservación de la integridad del citoesqueleto incluso en axones desmielinizados. El screen proteómico mostró que los

inhibidores de CRM1 en neuronas previenen la exportación nuclear de moléculas asociadas con daño axonal como TAU, previniendo así la disrupción de la integridad del citoesqueleto, mientras que retienen factores de transcripción “protectores” como NFR2, que es responsable de la transcripción de genes que participan en la defensa anti-oxidante.

La mayoría de las terapias disponibles actualmente para la EM pertenecen al grupo de terapias inmunomoduladoras o inmunosupresoras, dirigidas contra la función de las células inmunes periféricas o contra la capacidad de las células inmunes de cruzar la BHE. Nuestro estudio muestra que los componentes KPT proveen neuroprotección dirigiéndose hacia múltiples causas del daño axonal. KPT350 ha mostrado proteger los axones de forma directa uniéndose a CRM1, de tal manera que preserva el transporte axonal a la vez que favorece la acumulación nuclear de moléculas “protectoras”; e indirectamente reduciendo la inflamación al interferir en la proliferación de las células inmunes. Esto sugiere que el desplazamiento de cargos nucleares es importante para el proceso de neurodegeneración, y que estrategias dirigidas a inhibir la exportación nuclear podrían ser efectivas reduciendo el daño axonal.

### **Perspectivas y estudios futuros**

Como estudios futuros, podría analizarse la antigenicidad de los distintos superantígenos codificados por los distintos haplotipos, estimulando con cada uno de ellos un cultivo de PBMCs humanos o inyectándoselo a ratones SCID trasplantados con células sanguíneas periféricas humanas, como ya se ha hecho anteriormente en el caso de MSRV<sup>[161]</sup>, midiendo la cantidad de citoquinas proinflamatorias y TNF $\alpha$  secretadas, para comprobar si existe alguna diferencia de antigenicidad entre ellos. Además, con el fin de comprobar si los retrovirus están involucrados en el desencadenamiento de la enfermedad o bien si son causa secundaria y a través de sus efectos contribuyen a mantener la inflamación subyacente, sería de gran utilidad conseguir muestras previas a los brotes y comparar la expresión de los distintos retrovirus con la existente en el período de brote y con aquella en período de remisión, con el objetivo de comprobar si existe o no una expresión incrementada de los retrovirus responsable de la sintomatología, o si por el contrario ocurre como consecuencia; sin embargo, esto resulta muy complicado debido a que actualmente es casi imposible predecir cuándo va a tener lugar un brote, por lo que habría que tomar muestras de los pacientes de forma frecuente teniendo en cuenta que el efecto del tratamiento que estuviesen siguiendo podría interferir en dicha expresión (estudios previos muestran una reducción de ciertos HERVs correlacionado con un tratamiento efectivo<sup>[187, 188, 204, 205]</sup>). En relación a este tema, es muy interesante el hecho de que existan estudios correlacionando el aumento del número de brotes en relación al incremento de los títulos de IgG e IgM anti-HHV6A/B<sup>[236, 237]</sup>, indicando que la infección o reactivación de HHV-6 o la respuesta inmune frente a antígenos de HHV-6 podría influir en el riesgo a sufrir brotes de EM y en la posible progresión hacia un curso progresivo de EM<sup>[237]</sup>, lo



que podría ser consecuencia de una reactivación de la expresión de HERVs estimulada por dichos herpesvirus, convirtiéndose en un nexo de unión entre unos de los factores ambientales más relacionados con la EM y la genética.

Referente al estudio de la identificación de marcadores de riesgo frente al desarrollo de reacciones alérgicas tras la administración del Natalizumab, sería muy interesante ampliar este estudio con una cohorte independiente más amplia, para poder replicar nuestros resultados, ya que se trata de datos muy valiosos a la hora de ayudar a prevenir el desarrollo de reacciones anafilácticas frente al Natalizumab y tratarse de un dato de gran utilidad a la hora de elegir un tratamiento adecuado para cada uno de los pacientes. Del mismo modo también sería muy interesante tanto empezar a genotipar a los nuevos pacientes, como seguir de cerca a los pacientes tratados con Natalizumab que no hayan desarrollado reacciones anafilácticas pero que posean los alelos *HLA-DRB1\*13* y *HLA-DRB1\*14* descritos en nuestro estudio como alelos de riesgo.

En cuanto al tratamiento con inhibidores de CRM1, hemos estudiado un grupo de compuestos farmacológicos que parecen bloquear la inflamación y el daño a las células nerviosas en modelos animales de EM. Este nuevo compuesto puede suponer una nueva base en la que trabajar en vista a desarrollar ensayos clínicos en pacientes de EM, debiendo determinarse la eficacia y seguridad de dichos compuestos en humanos.



## CONCLUSIONES

1. De los 3 SNPs (rs6622139, rs6622140 y rs1290413) y 2 mutaciones existentes en la copia de HERV-W situada en el CrX, solo uno de ellos, rs6622139, se encuentra asociado con la susceptibilidad a desarrollar EM en mujeres y con la severidad de la misma, apuntando a esta inserción como posible origen cromosómico de Env del tipo MSRV.
2. Ninguno de los 2 SNPs presentes en la copia de HERV-W situada en el Cr20 (NCBI\_ss# SNP1: 974293065 y SNP2:974293066) se encuentran asociados con la susceptibilidad a desarrollar EM, por lo que dicha copia queda descartada como origen genómico de Env del tipo MSRV.
3. HERV-K18 se encuentra asociado con el riesgo a padecer enfermedades autoinmunes, delimitando esta asociación al haplotipo HERV-K18.3.
4. El polimorfismo rs391745, situado cerca de la inserción de HERV-Fc1 y estudiado previamente en poblaciones del Norte de Europa, se encuentra asociado con la susceptibilidad a desarrollar EM. Dicha asociación se delimita a las formas no PP de la enfermedad.
5. El genotipado de la región *HLA-DRB1* podría utilizarse como método informativo previo al tratamiento con Natalizumab, con el fin de identificar a los pacientes con un mayor riesgo de desarrollar reacciones de hipersensibilidad frente al tratamiento. Los alelos *HLA-DRB1\*13* y *HLA-DRB1\*14* se encuentran incrementados entre los pacientes que desarrollaron reacciones anafilácticas/anafilactoides, mientras que el ser portador del alelo *HLA-DRB1\*15* parece estar asociado con un efecto protector.
6. Las estrategias dirigidas a inhibir la exportación nuclear podrían ser efectivas reduciendo el daño axonal presente en las enfermedades neurodegenerativas como la EM, ya que la administración oral de inhibidores reversibles KPT en modelos murinos preclínicos de desmielinización atenúa significativamente la progresión de la enfermedad, disminuyendo la proliferación de células inmunes y preservando la integridad del citoesqueleto incluso en axones desmielinizados





## BIBLIOGRAFÍA

1. Noseworthy, J.H., et al., *Multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2000. **343**(13): p. 938-52.
2. Compston, A. and A. Coles, *Multiple sclerosis*. Lancet, 2008. **372**(9648): p. 1502-17.
3. Oksenberg, J.R. and S.E. Baranzini, *Multiple sclerosis genetics--is the glass half full, or half empty?* Nat Rev Neurol, 2010. **6**(8): p. 429-37.
4. Fugger, L., M.A. Friese, and J.I. Bell, *From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(6): p. 408-17.
5. Koch, M.W., L.M. Metz, and O. Kovalchuk, *Epigenetic changes in patients with multiple sclerosis*. Nat Rev Neurol, 2012. **9**(1): p. 35-43.
6. Zhang, Z. and R. Zhang, *Epigenetics in autoimmune diseases: Pathogenesis and prospects for therapy*. Autoimmun Rev, 2015.
7. Lucchinetti, C.F., et al., *Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2011. **365**(23): p. 2188-97.
8. Browne, P., et al., *Atlas of Multiple Sclerosis 2013: A growing global problem with widespread inequity*. Neurology, 2013. **83**(11): p. 1022-4.
9. Federation, M.S.I., *Atlas of MS 2013: Mapping Multiple Sclerosis Around the World*. 2013: London.
10. Wade, B.J., *Spatial analysis of global prevalence of multiple sclerosis suggests need for an updated prevalence scale*. Mult Scler Int, 2014. **2014**: p. 124578.
11. Dean, G. and J.F. Kurtzke, *On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa*. Br Med J, 1971. **3**(5777): p. 725-9.
12. Kurtzke, J.F., *Epidemiologic evidence for multiple sclerosis as an infection*. Clin Microbiol Rev, 1993. **6**(4): p. 382-427.
13. Templer, D.I., et al., *Season of birth in multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand, 1992. **85**(2): p. 107-9.
14. Bayes, H.K., C.J. Weir, and C. O'Leary, *Timing of birth and risk of multiple sclerosis in the Scottish population*. Eur Neurol, 2009. **63**(1): p. 36-40.
15. Disanto, G., et al., *Month of birth, vitamin D and risk of immune-mediated disease: a case control study*. BMC Med, 2012. **10**: p. 69.
16. Dobson, R., G. Giovannoni, and S. Ramagopalan, *The month of birth effect in multiple sclerosis: systematic review, meta-analysis and effect of latitude*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2012. **84**(4): p. 427-32.
17. Ascherio, A., et al., *Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study*. Jama, 2001. **286**(24): p. 3083-8.

18. Lindsey, J.W., et al., *The antibody response to Epstein-Barr virions is altered in multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2013. **254**(1-2): p. 146-53.
19. Mechelli, R., et al., *Epstein-Barr virus genetic variants are associated with multiple sclerosis*. Neurology, 2015. **84**(13): p. 1362-8.
20. Mouhieddine, T.H., et al., *Risk factors for multiple sclerosis and associations with anti-EBV antibody titers*. Clin Immunol, 2015. **158**(1): p. 59-66.
21. Hayes, C.E., *Vitamin D: a natural inhibitor of multiple sclerosis*. Proc Nutr Soc, 2000. **59**(4): p. 531-5.
22. Nashold, F.E., D.J. Miller, and C.E. Hayes, *1,25-dihydroxyvitamin D3 treatment decreases macrophage accumulation in the CNS of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 2000. **103**(2): p. 171-9.
23. Mirzaei, F., et al., *Gestational vitamin D and the risk of multiple sclerosis in offspring*. Ann Neurol, 2011. **70**(1): p. 30-40.
24. Correale, J., M.C. Ysraelit, and M.I. Gaitan, *Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis*. Brain, 2009. **132**(Pt 5): p. 1146-60.
25. Ascherio, A., K.L. Munger, and K.C. Simon, *Vitamin D and multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2010. **9**(6): p. 599-612.
26. Bartosik-Psujek, H., et al., *Immunomodulatory effects of vitamin D on monocyte-derived dendritic cells in multiple sclerosis*. Mult Scler, 2010. **16**(12): p. 1513-6.
27. Pierrot-Deseilligny, C. and J.C. Souberbielle, *Contribution of vitamin D insufficiency to the pathogenesis of multiple sclerosis*. Ther Adv Neurol Disord, 2013. **6**(2): p. 81-116.
28. Riccio, P. and R. Rossano, *Nutrition facts in multiple sclerosis*. ASN Neuro, 2015. **7**(1).
29. Farez, M.F., et al., *Sodium intake is associated with increased disease activity in multiple sclerosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2015. **86**(1): p. 26-31.
30. Hedstrom, A.K., T. Olsson, and L. Alfredsson, *High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women*. Mult Scler, 2012. **18**(9): p. 1334-6.
31. Hedstrom, A.K., et al., *Obesity interacts with infectious mononucleosis in risk of multiple sclerosis*. Eur J Neurol, 2015. **22**(3): p. 578-e38.
32. Koudriavtseva, T., et al., *Association between Anemia and Multiple Sclerosis*. Eur Neurol, 2015. **73**(3-4): p. 233-237.
33. Cantarel, B.L., et al., *Gut Microbiota in Multiple Sclerosis: Possible Influence of Immunomodulators*. J Investig Med, 2015. **65**(5).
34. Mielcarz, D.W. and L.H. Kasper, *The gut microbiome in multiple sclerosis*. Curr Treat Options Neurol, 2015. **17**(4): p. 344.
35. Hernan, M.A., et al., *Cigarette smoking and the progression of multiple sclerosis*. Brain, 2005. **128**(Pt 6): p. 1461-5.

36. Hernan, M.A., M.J. Olek, and A. Ascherio, *Cigarette smoking and incidence of multiple sclerosis*. Am J Epidemiol, 2001. **154**(1): p. 69-74.
37. Di Pauli, F., et al., *Smoking is a risk factor for early conversion to clinically definite multiple sclerosis*. Mult Scler, 2008. **14**(8): p. 1026-30.
38. Healy, B.C., et al., *Smoking and disease progression in multiple sclerosis*. Arch Neurol, 2009. **66**(7): p. 858-64.
39. Hedstrom, A.K., et al., *Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis*. Mult Scler, 2011. **17**(7): p. 788-93.
40. Hedstrom, A.K., et al., *Tobacco smoking, but not Swedish snuff use, increases the risk of multiple sclerosis*. Neurology, 2009. **73**(9): p. 696-701.
41. Handel, A.E., et al., *Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis*. PLoS One, 2011. **6**(1): p. e16149.
42. Belbasis, L., et al., *Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses*. Lancet Neurol, 2015. **14**(3): p. 263-73.
43. Okuda, D.T., et al., *Radiologically isolated syndrome: 5-year risk for an initial clinical event*. PLoS One, 2014. **9**(3): p. e90509.
44. Sospedra, M. and R. Martin, *Immunology of multiple sclerosis*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 683-747.
45. Stys, P.K., et al., *Will the real multiple sclerosis please stand up?* Nat Rev Neurosci, 2012. **13**(7): p. 507-14.
46. Hauser, S.L. and J.R. Oksenberg, *The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration*. Neuron, 2006. **52**(1): p. 61-76.
47. Trojano, M., et al., *The transition from relapsing-remitting MS to irreversible disability: clinical evaluation*. Neurol Sci, 2003. **24 Suppl 5**: p. S268-70.
48. Tullman, M.J., et al., *Clinical characteristics of progressive relapsing multiple sclerosis*. Mult Scler, 2004. **10**(4): p. 451-4.
49. Capello, E. and G.L. Mancardi, *Marburg type and Balo's concentric sclerosis: rare and acute variants of multiple sclerosis*. Neurol Sci, 2004. **25 Suppl 4**: p. S361-3.
50. Nylander, A. and D.A. Hafler, *Multiple sclerosis*. J Clin Invest, 2012. **122**(4): p. 1180-8.
51. Disanto, G., et al., *The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis*. Neurology, 2012. **78**(11): p. 823-32.
52. Serafini, B., et al., *Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis*. Brain Pathol, 2004. **14**(2): p. 164-74.
53. Su, K.G., et al., *Axonal degeneration in multiple sclerosis: the mitochondrial hypothesis*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2009. **9**(5): p. 411-7.
54. Kim, J.Y. and P. Casaccia, *HDAC1 in axonal degeneration: A matter of subcellular localization*. Cell Cycle, 2010. **9**(18): p. 3680-4.

55. Nguyen, K.T., M.P. Holloway, and R.A. Altura, *The CRM1 nuclear export protein in normal development and disease*. Int J Biochem Mol Biol, 2012. **3**(2): p. 137-51.
56. Kim, J.Y., et al., *HDAC1 nuclear export induced by pathological conditions is essential for the onset of axonal damage*. Nat Neurosci, 2010. **13**(2): p. 180-9.
57. Campbell, G.R., J.T. Worrall, and D.J. Mahad, *The central role of mitochondria in axonal degeneration in multiple sclerosis*. Mult Scler, 2014. **20**(14): p. 1806-13.
58. Sanchez-Seco, V.G., I. Casanova Peno, and R. Arroyo Gonzalez, *[Monoclonal antibodies for the treatment of multiple sclerosis]*. Med Clin (Barc), 2014. **143 Suppl 3**: p. 30-4.
59. Noseworthy, J.H. and P. Kirkpatrick, *Natalizumab*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(2): p. 101-2.
60. Rice, G.P., H.P. Hartung, and P.A. Calabresi, *Anti-alpha4 integrin therapy for multiple sclerosis: mechanisms and rationale*. Neurology, 2005. **64**(8): p. 1336-42.
61. Antonio Garcia Merino, J., *[Current therapy of multiple sclerosis]*. Med Clin (Barc), 2014. **143 Suppl 3**: p. 19-22.
62. Mahad, D.H., B.D. Trapp, and H. Lassmann, *Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis*. Lancet Neurol, 2015. **14**(2): p. 183-193.
63. Polman, C.H., et al., *A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2006. **354**(9): p. 899-910.
64. Medicamento, A.E.d., *Tysabri, INN-natalizumab*. 2014.
65. Langer-Gould, A., et al., *Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab*. N Engl J Med, 2005. **353**(4): p. 375-81.
66. Kleinschmidt-DeMasters, B.K. and K.L. Tyler, *Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2005. **353**(4): p. 369-74.
67. Van Assche, G., et al., *Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease*. N Engl J Med, 2005. **353**(4): p. 362-8.
68. Kornek, B., *An update on the use of natalizumab in the treatment of multiple sclerosis: appropriate patient selection and special considerations*. Patient Prefer Adherence, 2015. **9**: p. 675-84.
69. Rudick, R.A., et al., *Natalizumab plus interferon beta-1a for relapsing multiple sclerosis*. N Engl J Med, 2006. **354**(9): p. 911-23.
70. O'Connor, P., et al., *Long-term safety and effectiveness of natalizumab redosing and treatment in the STRATA MS Study*. Neurology, 2014. **83**(1): p. 78-86.
71. Butzkueven, H., et al., *Efficacy and safety of natalizumab in multiple sclerosis: interim observational programme results*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2014. **85**(11): p. 1190-7.
72. Matsushima, G.K. and P. Morell, *The neurotoxicant, cuprizone, as a model to study demyelination and remyelination in the central nervous system*. Brain Pathol, 2001. **11**(1): p. 107-16.



73. Tsunoda, I. and R.S. Fujinami, *Neuropathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus infection, an animal model for multiple sclerosis*. J Neuroimmune Pharmacol, 2010. **5**(3): p. 355-69.
74. Batoulis, H., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis--achievements and prospective advances*. Apmis, 2011. **119**(12): p. 819-30.
75. Rivers, T.M., D.H. Sprunt, and G.P. Berry, *Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys*. J Exp Med, 1933. **58**(1): p. 39-53.
76. Robinson, A.P., et al., *The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment*. Handb Clin Neurol, 2014. **122**: p. 173-89.
77. Ridge, S.C., et al., *Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by mitoxantrone*. Clin Immunol Immunopathol, 1985. **35**(1): p. 35-42.
78. Lublin, F.D., et al., *Suppression of acute and relapsing experimental allergic encephalomyelitis with mitoxantrone*. Clin Immunol Immunopathol, 1987. **45**(1): p. 122-8.
79. Begum-Haque, S., et al., *Increased expression of B cell-associated regulatory cytokines by glatiramer acetate in mice with experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 2010. **219**(1-2): p. 47-53.
80. Scorisa, J.M., et al., *Glatiramer acetate treatment increases stability of spinal synapses and down regulates MHC I during the course of EAE*. Int J Biol Sci, 2011. **7**(8): p. 1188-202.
81. Toker, A., et al., *Glatiramer acetate treatment directly targets CD11b(+)Ly6G(-) monocytes and enhances the suppression of autoreactive T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis*. Scand J Immunol, 2011. **74**(3): p. 235-43.
82. Aharoni, R., et al., *Magnetic resonance imaging characterization of different experimental autoimmune encephalomyelitis models and the therapeutic effect of glatiramer acetate*. Exp Neurol, 2013. **240**: p. 130-44.
83. Gentile, A., et al., *Glatiramer acetate protects against inflammatory synaptopathy in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmune Pharmacol, 2013. **8**(3): p. 651-63.
84. Steinman, L. and S.S. Zamvil, *Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis*. Trends Immunol, 2005. **26**(11): p. 565-71.
85. Coisne, C., W. Mao, and B. Engelhardt, *Cutting edge: Natalizumab blocks adhesion but not initial contact of human T cells to the blood-brain barrier in vivo in an animal model of multiple sclerosis*. J Immunol, 2009. **182**(10): p. 5909-13.
86. Gan, Y., et al., *Antibody to alpha4 integrin suppresses natural killer cells infiltration in central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Neuroimmunol, 2013. **247**(1-2): p. 9-15.
87. Mindur, J.E., et al., *Early treatment with anti-VLA-4 mAb can prevent the infiltration and/or development of pathogenic CD11b+CD4+ T cells in the CNS during progressive EAE*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99068.

88. Fujino, M., et al., *Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by FTY720 treatment*. J Pharmacol Exp Ther, 2003. **305**(1): p. 70-7.
89. Webb, M., et al., *Sphingosine 1-phosphate receptor agonists attenuate relapsing-remitting experimental autoimmune encephalitis in SJL mice*. J Neuroimmunol, 2004. **153**(1-2): p. 108-21.
90. Milo, R. and E. Kahana, *Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment*. Autoimmun Rev, 2010. **9**(5): p. A387-94.
91. Lander, E.S. and N.J. Schork, *Genetic dissection of complex traits*. Science, 1994. **265**(5181): p. 2037-48.
92. Alter, M., et al., *Genetic association of multiple sclerosis and HL-A determinants*. Neurology, 1976. **26**(1): p. 31-6.
93. Bertrams, H.J. and E.K. Kuwert, *Association of histocompatibility haplotype HLA-A3-B7 with multiple sclerosis*. J Immunol, 1976. **117**(5 Pt.2): p. 1906-12.
94. Saito, S., et al., *HLA studies on multiple sclerosis in Japan*. Neurology, 1976. **26**(6 PT 2): p. 49.
95. Sawcer, S., et al., *A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22*. Nat Genet, 1996. **13**(4): p. 464-8.
96. Haines, J.L., et al., *A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex*. The Multiple Sclerosis Genetics Group. Nat Genet, 1996. **13**(4): p. 469-71.
97. Ebers, G.C., et al., *A full genome search in multiple sclerosis*. Nat Genet, 1996. **13**(4): p. 472-6.
98. Gourraud, P.A., et al., *The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review*. Immunol Rev, 2012. **248**(1): p. 87-103.
99. Sawcer, S., et al., *A high-density screen for linkage in multiple sclerosis*. Am J Hum Genet, 2005. **77**(3): p. 454-67.
100. Sawcer, S., R.J. Franklin, and M. Ban, *Multiple sclerosis genetics*. Lancet Neurol, 2014. **13**(7): p. 700-9.
101. IMSSGC, et al., *Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study*. N Engl J Med, 2007. **357**(9): p. 851-62.
102. IMSSGC, et al., *Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis*. Nature, 2011. **476**(7359): p. 214-9.
103. IMSSGC, et al., *Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis*. Nat Genet, 2013. **45**(11): p. 1353-60.
104. Hampe, J., et al., *A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1*. Nat Genet, 2007. **39**(2): p. 207-11.
105. Hou, L. and H. Zhao, *A review of post-GWAS prioritization approaches*. Front Genet, 2013. **4**: p. 280.

106. Farh, K.K., et al., *Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants*. Nature, 2014. **518**(7539): p. 337-43.
107. Maurano, M.T., et al., *Systematic localization of common disease-associated variation in regulatory DNA*. Science, 2014. **337**(6099): p. 1190-5.
108. Elangovan, R.I., et al., *Regulatory genomic regions active in immune cell types explain a large proportion of the genetic risk of multiple sclerosis*. J Hum Genet, 2014. **59**(4): p. 211-5.
109. Lee, M.N., et al., *Common genetic variants modulate pathogen-sensing responses in human dendritic cells*. Science, 2014. **343**(6175): p. 1246980.
110. Shiina, T., et al., *The HLA genomic loci map: expression, interaction, diversity and disease*. J Hum Genet, 2009. **54**(1): p. 15-39.
111. Barcellos, L.F., et al., *Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis*. Hum Mol Genet, 2006. **15**(18): p. 2813-24.
112. Etzensperger, R., et al., *Dissection of the multiple sclerosis associated DR2 haplotype*. J Autoimmun, 2008. **31**(3): p. 201-7.
113. Ribet, D. and T. Heidman, *Formation et évolution des rétrovirus endogènes*. Virologie, 2010. **14**(2): p. 141-50.
114. Coffin, J.M., *Structure, replication, and recombination of retrovirus genomes: some unifying hypotheses*. J Gen Virol, 1979. **42**(1): p. 1-26.
115. Chuong, E.B., *Retroviruses facilitate the rapid evolution of the mammalian placenta*. Bioessays, 2013. **35**(10): p. 853-61.
116. Perron, H., et al., *Endogenous retroviral genes, Herpesviruses and gender in Multiple Sclerosis*. J Neurol Sci, 2009. **286**(1-2): p. 65-72.
117. Douville, R.N. and A. Nath, *Human endogenous retroviruses and the nervous system*. Handb Clin Neurol, 2014. **123**: p. 465-85.
118. Lander, E.S., et al., *Initial sequencing and analysis of the human genome*. Nature, 2001. **409**(6822): p. 860-921.
119. Belshaw, R., et al., *High copy number in human endogenous retrovirus families is associated with copying mechanisms in addition to reinfection*. Mol Biol Evol, 2005. **22**(4): p. 814-7.
120. Voisset, C., R.A. Weiss, and D.J. Griffiths, *Human RNA "rumor" viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. **72**(1): p. 157-96.
121. Gifford, R. and M. Tristem, *The evolution, distribution and diversity of endogenous retroviruses*. Virus Genes, 2003. **26**(3): p. 291-315.
122. Ryan, F.P., *Human endogenous retroviruses in multiple sclerosis: potential for novel neuro-pharmacological research*. Curr Neuropharmacol, 2011. **9**(2): p. 360-9.
123. Gonzalez Fernandez, C.M., *Artritis Infecciosas*. Panamericana ed. Vol. 1. 2006. 341.

124. Jintaridth, P. and A. Mutirangura, *Distinctive patterns of age-dependent hypomethylation in interspersed repetitive sequences*. *Physiol Genomics*, 2010. **41**(2): p. 194-200.
125. Patel, M.R., M. Emerman, and H.S. Malik, *Paleovirology - ghosts and gifts of viruses past*. *Curr Opin Virol*, 2011. **1**(4): p. 304-9.
126. Dupressoir, A. and T. Heidmann, *[Syncytins - retroviral envelope genes captured for the benefit of placental development]*. *Med Sci (Paris)*, 2011. **27**(2): p. 163-9.
127. Buscher, K., et al., *Expression of human endogenous retrovirus K in melanomas and melanoma cell lines*. *Cancer Res*, 2005. **65**(10): p. 4172-80.
128. Herbst, H., et al., *Human endogenous retrovirus (HERV)-K transcripts in gonadoblastomas and gonadoblastoma-derived germ cell tumours*. *Virchows Arch*, 1999. **434**(1): p. 11-5.
129. Lower, R., et al., *Human teratocarcinomas cultured in vitro produce unique retrovirus-like viruses*. *J Gen Virol*, 1984. **65** ( Pt 5): p. 887-98.
130. Wang-Johanning, F., et al., *Expression of multiple human endogenous retrovirus surface envelope proteins in ovarian cancer*. *Int J Cancer*, 2007. **120**(1): p. 81-90.
131. Florl, A.R., et al., *DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas*. *Br J Cancer*, 1999. **80**(9): p. 1312-21.
132. Menendez, L., B.B. Benigno, and J.F. McDonald, *L1 and HERV-W retrotransposons are hypomethylated in human ovarian carcinomas*. *Mol Cancer*, 2004. **3**: p. 12.
133. Wentzensen, N., et al., *Expression of an endogenous retroviral sequence from the HERV-H group in gastrointestinal cancers*. *Int J Cancer*, 2007. **121**(7): p. 1417-23.
134. Sicat, J., N. Sutkowski, and B.T. Huber, *Expression of human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen is elevated in juvenile rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 2005. **32**(9): p. 1821-31.
135. Moles, J.P., A. Tesniere, and J.J. Guilhou, *A new endogenous retroviral sequence is expressed in skin of patients with psoriasis*. *Br J Dermatol*, 2005. **153**(1): p. 83-9.
136. Wu, Z., et al., *DNA methylation modulates HERV-E expression in CD4+ T cells from systemic lupus erythematosus patients*. *J Dermatol Sci*, 2015. **77**(2): p. 110-6.
137. Frank, O., et al., *Altered transcriptional activity of human endogenous retroviruses in neuroepithelial cells after infection with Toxoplasma gondii*. *J Infect Dis*, 2006. **194**(10): p. 1447-9.
138. Tai, A.K., et al., *Human endogenous retrovirus-K18 Env as a risk factor in multiple sclerosis*. *Mult Scler*, 2008. **14**(9): p. 1175-80.
139. Nexø, B.A., et al., *The etiology of multiple sclerosis: genetic evidence for the involvement of the human endogenous retrovirus HERV-Fc1*. *PLoS One*, 2011. **6**(2): p. e16652.
140. Hansen, B., et al., *Genetic association of multiple sclerosis with the marker rs391745 near the endogenous retroviral locus HERV-Fc1: analysis of disease subtypes*. *PLoS One*, 2011. **6**(10): p. e26438.



141. Young, G.R., et al., *Resurrection of endogenous retroviruses in antibody-deficient mice*. Nature, 2012. **491**(7426): p. 774-8.
142. Lee, Y.N. and P.D. Bieniasz, *Reconstitution of an infectious human endogenous retrovirus*. PLoS Pathog, 2007. **3**(1): p. e10.
143. Hawkes, C.H., et al., *Seroprevalence of herpes simplex virus type 2 in multiple sclerosis*. Acta Neurol Scand, 2006. **114**(6): p. 363-7.
144. Li, F., et al., *Transcriptional derepression of the ERVWE1 locus following influenza A virus infection*. J Virol, 2014. **88**(8): p. 4328-37.
145. Brudek, T., et al., *B cells and monocytes from patients with active multiple sclerosis exhibit increased surface expression of both HERV-H Env and HERV-W Env, accompanied by increased seroreactivity*. Retrovirology, 2009. **6**: p. 104.
146. Ruprecht, K., et al., *Regulation of human endogenous retrovirus W protein expression by herpes simplex virus type 1: implications for multiple sclerosis*. J Neurovirol, 2006. **12**(1): p. 65-71.
147. Alvarez-Lafuente, R., et al., *Herpesviruses and human endogenous retroviral sequences in the cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients*. Mult Scler, 2008. **14**(5): p. 595-601.
148. DeLorenze, G.N., et al., *Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up*. Arch Neurol, 2006. **63**(6): p. 839-44.
149. Nielsen, T.R., et al., *Correlations between Epstein-Barr virus antibody levels and risk factors for multiple sclerosis in healthy individuals*. Mult Scler, 2007. **13**(3): p. 420-3.
150. Mameli, G., et al., *Expression and activation by Epstein Barr virus of human endogenous retroviruses-W in blood cells and astrocytes: inference for multiple sclerosis*. PLoS One, 2012. **7**(9): p. e44991.
151. Manghera, M. and R.N. Douville, *Endogenous retrovirus-K promoter: a landing strip for inflammatory transcription factors?* Retrovirology, 2013. **10**: p. 16.
152. Mameli, G., et al., *Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 1): p. 264-74.
153. Kaiser, S.M., H.S. Malik, and M. Emerman, *Restriction of an extinct retrovirus by the human TRIM5alpha antiviral protein*. Science, 2007. **316**(5832): p. 1756-8.
154. Pertel, T., et al., *TRIM5 is an innate immune sensor for the retrovirus capsid lattice*. Nature, 2011. **472**(7343): p. 361-5.
155. Matouskova, M., et al., *CpG methylation suppresses transcriptional activity of human syncytin-1 in non-placental tissues*. Exp Cell Res, 2006. **312**(7): p. 1011-20.
156. Reiss, D., Y. Zhang, and D.L. Mager, *Widely variable endogenous retroviral methylation levels in human placenta*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(14): p. 4743-54.
157. Young, G.R., J.P. Stoye, and G. Kassiotis, *Are human endogenous retroviruses pathogenic? An approach to testing the hypothesis*. Bioessays, 2013. **35**(9): p. 794-803.

158. Misra, A., et al., *Alteration of a sequence with homology to human endogenous retrovirus (HERV-K) in primary human glioma: implications for viral repeat mediated rearrangement*. Mutat Res, 2001. **484**(1-2): p. 53-9.
159. Kelley, D. and J. Rinn, *Transposable elements reveal a stem cell-specific class of long noncoding RNAs*. Genome Biol, 2012. **13**(11): p. R107.
160. Kremer, D., et al., *Human endogenous retrovirus type W envelope protein inhibits oligodendroglial precursor cell differentiation*. Ann Neurol, 2013. **74**(5): p. 721-32.
161. Rolland, A., et al., *The envelope protein of a human endogenous retrovirus-W family activates innate immunity through CD14/TLR4 and promotes Th1-like responses*. J Immunol, 2006. **176**(12): p. 7636-44.
162. Hurst, T. and G. Magiorkinis, *Activation of the innate immune response by endogenous retroviruses*. J Gen Virol, 2014. **96**((Pt 6)): p. 1207-18.
163. Zhang, J., et al., *Activation and clonal expansion of human myelin basic protein-reactive T cells by bacterial superantigens*. J Autoimmun, 1995. **8**(4): p. 615-32.
164. Mangeney, M., et al., *Placental syncytins: Genetic disjunction between the fusogenic and immunosuppressive activity of retroviral envelope proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(51): p. 20534-9.
165. Morozov, V.A., V.L. Dao Thi, and J. Denner, *The transmembrane protein of the human endogenous retrovirus--K (HERV-K) modulates cytokine release and gene expression*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70399.
166. Grasset, E.K. and A. Cerutti, *Immunology. Retroviral help for B cells*. Science, 2014. **346**(6216): p. 1454-5.
167. Zeng, M., et al., *MAVS, cGAS, and endogenous retroviruses in T-independent B cell responses*. Science, 2013. **346**(6216): p. 1486-92.
168. Moyes, D., D.J. Griffiths, and P.J. Venables, *Insertional polymorphisms: a new lease of life for endogenous retroviruses in human disease*. Trends Genet, 2007. **23**(7): p. 326-33.
169. Garson, J.A., et al., *Detection of virion-associated MSRV-RNA in serum of patients with multiple sclerosis*. Lancet, 1998. **351**(9095): p. 33.
170. Dolei, A., et al., *Multiple sclerosis-associated retrovirus (MSRV) in Sardinian MS patients*. Neurology, 2002. **58**(3): p. 471-3.
171. Arru, G., et al., *Multiple Sclerosis and HERV-W/MSRV: A Multicentric Study*. Int J Biomed Sci, 2007. **3**(4): p. 292-7.
172. Dolei, A. and H. Perron, *The multiple sclerosis-associated retrovirus and its HERV-W endogenous family: a biological interface between virology, genetics, and immunology in human physiology and disease*. J Neurovirol, 2009. **15**(1): p. 4-13.
173. Perron, H., et al., *Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease*. Mult Scler, 2012. **18**(12): p. 1721-36.

174. Garcia-Montojo, M., et al., *The DNA copy number of human endogenous retrovirus-W (MSRV-type) is increased in multiple sclerosis patients and is influenced by gender and disease severity*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53623.
175. Palmarini, M., M. Mura, and T.E. Spencer, *Endogenous betaretroviruses of sheep: teaching new lessons in retroviral interference and adaptation*. J Gen Virol, 2004. **85**(Pt 1): p. 1-13.
176. Roy-Burman, P., *Endogenous env elements: partners in generation of pathogenic feline leukemia viruses*. Virus Genes, 1995. **11**(2-3): p. 147-61.
177. Antony, J.M., et al., *The human endogenous retrovirus envelope glycoprotein, syncytin-1, regulates neuroinflammation and its receptor expression in multiple sclerosis: a role for endoplasmic reticulum chaperones in astrocytes*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 1210-24.
178. Antony, J.M., et al., *Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination*. Nat Neurosci, 2004. **7**(10): p. 1088-95.
179. Antony, J.M., et al., *Comparative expression of human endogenous retrovirus-W genes in multiple sclerosis*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2007. **23**(10): p. 1251-6.
180. Dolei, A., *MSRV/HERV-W/syncytin and its linkage to multiple sclerosis: the usability and the hazard of a human endogenous retrovirus*. J Neurovirol, 2005. **11**(2): p. 232-5.
181. Laska, M.J., et al., *Expression of HERV-Fc1, a human endogenous retrovirus, is increased in patients with active multiple sclerosis*. J Virol, 2012. **86**(7): p. 3713-22.
182. Mameli, G., et al., *Regulation of the syncytin-1 promoter in human astrocytes by multiple sclerosis-related cytokines*. Virology, 2007. **362**(1): p. 120-30.
183. Rolland, A., et al., *Correlation between disease severity and in vitro cytokine production mediated by MSRV (multiple sclerosis associated retroviral element) envelope protein in patients with multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2005. **160**(1-2): p. 195-203.
184. Schmitt, K., et al., *Comprehensive analysis of human endogenous retrovirus group HERV-W locus transcription in multiple sclerosis brain lesions by high-throughput amplicon sequencing*. J Virol, 2013. **87**(24): p. 13837-52.
185. Sotgiu, S., et al., *Multiple sclerosis-associated retrovirus in early multiple sclerosis: a six-year follow-up of a Sardinian cohort*. Mult Scler, 2006. **12**(6): p. 698-703.
186. Marguerat, S., et al., *Association of human endogenous retrovirus K-18 polymorphisms with type 1 diabetes*. Diabetes, 2004. **53**(3): p. 852-4.
187. Arru, G., et al., *Natalizumab inhibits the expression of human endogenous retroviruses of the W family in multiple sclerosis patients: a longitudinal cohort study*. Mult Scler, 2014. **20**(2): p. 174-82.
188. Mameli, G., et al., *Inhibition of multiple-sclerosis-associated retrovirus as biomarker of interferon therapy*. J Neurovirol, 2008. **14**(1): p. 73-7.
189. Rhyu, D.W., et al., *Expression of human endogenous retrovirus env genes in the blood of breast cancer patients*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(6): p. 9173-83.

190. Kremer, D., et al., *The neutralizing antibody GNBAC1 abrogates HERV-W envelope protein-mediated oligodendroglial maturation blockade*. Mult Scler, 2014. **21**: p. 1200-1203.
191. Curtin, F., et al., *Preclinical and early clinical development of GNBAC1, a humanized IgG4 monoclonal antibody targeting endogenous retroviral MSRV-Env protein*. MAbs, 2015. **7**(1): p. 265-75.
192. Derfuss, T., et al., *A phase IIa randomised clinical study of GNBAC1, a humanised monoclonal antibody against the envelope protein of multiple sclerosis-associated endogenous retrovirus in multiple sclerosis patients*. Mult Scler, 2014. **21**: p. 885-93.
193. Curtin, F., et al., *GNBAC1, a humanized monoclonal antibody against the envelope protein of multiple sclerosis-associated endogenous retrovirus: a first-in-humans randomized clinical study*. Clin Ther, 2012. **34**(12): p. 2268-78.
194. Pavlicek, A., et al., *Processed pseudogenes of human endogenous retroviruses generated by LINEs: their integration, stability, and distribution*. Genome Res, 2002. **12**(3): p. 391-9.
195. Saresella, M., et al., *Multiple sclerosis-associated retroviral agent (MSRV)-stimulated cytokine production in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis*. Mult Scler, 2009. **15**(4): p. 443-7.
196. Antony, J.M., et al., *Quantitative analysis of human endogenous retrovirus-W env in neuroinflammatory diseases*. AIDS Res Hum Retroviruses, 2006. **22**(12): p. 1253-9.
197. Yao, Y., et al., *Elevated levels of human endogenous retrovirus-W transcripts in blood cells from patients with first episode schizophrenia*. Genes Brain Behav, 2008. **7**(1): p. 103-12.
198. Perron, H., et al., *Endogenous retrovirus type W GAG and envelope protein antigenemia in serum of schizophrenic patients*. Biol Psychiatry, 2008. **64**(12): p. 1019-23.
199. Antony, J.M., et al., *Human endogenous retroviruses and multiple sclerosis: innocent bystanders or disease determinants?* Biochim Biophys Acta, 2011. **1812**(2): p. 162-76.
200. Perron, H., et al., *Leptomeningeal cell line from multiple sclerosis with reverse transcriptase activity and viral particles*. Res Virol, 1989. **140**(6): p. 551-61.
201. Perron, H., et al., *Molecular identification of a novel retrovirus repeatedly isolated from patients with multiple sclerosis. The Collaborative Research Group on Multiple Sclerosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(14): p. 7583-8.
202. Komurian-Pradel, F., et al., *Molecular cloning and characterization of MSRV-related sequences associated with retrovirus-like particles*. Virology, 1999. **260**(1): p. 1-9.
203. Mameli, G., et al., *Novel reliable real-time PCR for differential detection of MSRVenv and syncytin-1 in RNA and DNA from patients with multiple sclerosis*. J Virol Methods, 2009. **161**(1): p. 98-106.
204. Serra, C., et al., *In vitro modulation of the multiple sclerosis (MS)-associated retrovirus by cytokines: implications for MS pathogenesis*. J Neurovirol, 2003. **9**(6): p. 637-43.
205. Mameli, G., et al., *Epitopes of HERV-Wenv induce antigen-specific humoral immunity in multiple sclerosis patients*. J Neuroimmunol, 2015. **280**: p. 66-8.

206. Perron, H., et al., *Human endogenous retrovirus protein activates innate immunity and promotes experimental allergic encephalomyelitis in mice*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e80128.
207. Roebke, C., et al., *An N-terminally truncated envelope protein encoded by a human endogenous retrovirus W locus on chromosome Xq22.3*. Retrovirology, 2010. **7**: p. 69.
208. Laufer, G., et al., *Analysis of transcribed human endogenous retrovirus W env loci clarifies the origin of multiple sclerosis-associated retrovirus env sequences*. Retrovirology, 2009. **6**: p. 37.
209. Firouzi, R., et al., *Multiple sclerosis-associated retrovirus particles cause T lymphocyte-dependent death with brain hemorrhage in humanized SCID mice model*. J Neurovirol, 2003. **9**(1): p. 79-93.
210. Perron, H., et al., *Multiple sclerosis retrovirus particles and recombinant envelope trigger an abnormal immune response in vitro, by inducing polyclonal Vbeta16 T-lymphocyte activation*. Virology, 2001. **287**(2): p. 321-32.
211. Kraus, B., et al., *Vaccination directed against the human endogenous retrovirus-K (HERV-K) gag protein slows HERV-K gag expressing cell growth in a murine model system*. Virol J, 2014. **11**: p. 58.
212. Kessler, A.F., et al., *Expression-analysis of the human endogenous retrovirus HERV-K in human astrocytic tumors*. BMC Res Notes, 2014. **7**: p. 159.
213. Hsiao, F.C., et al., *EBV LMP-2A employs a novel mechanism to transactivate the HERV-K18 superantigen through its ITAM*. Virology, 2009. **385**(1): p. 261-6.
214. Turcanova, V.L., B. Bundgaard, and P. Hollsberg, *Human herpesvirus-6B induces expression of the human endogenous retrovirus K18-encoded superantigen*. J Clin Virol, 2009. **46**(1): p. 15-9.
215. Tai, A.K., et al., *HHV-6A infection induces expression of HERV-K18-encoded superantigen*. J Clin Virol, 2009. **46**(1): p. 47-8.
216. Hsiao, F.C., et al., *Cutting edge: Epstein-Barr virus transactivates the HERV-K18 superantigen by docking to the human complement receptor 2 (CD21) on primary B cells*. J Immunol, 2006. **177**(4): p. 2056-60.
217. Christensen, T., *The role of EBV in MS pathogenesis*. Int MS J, 2006. **13**(2): p. 52-7.
218. Hollsberg, P., et al., *Presence of Epstein-Barr virus and human herpesvirus 6B DNA in multiple sclerosis patients: associations with disease activity*. Acta Neurol Scand, 2005. **112**(6): p. 395-402.
219. Angelini, D.F., et al., *Increased CD8+ T cell response to Epstein-Barr virus lytic antigens in the active phase of multiple sclerosis*. PLoS Pathog. **9**(4): p. e1003220.
220. Sutkowski, N., et al., *Epstein-Barr virus transactivates the human endogenous retrovirus HERV-K18 that encodes a superantigen*. Immunity, 2001. **15**(4): p. 579-89.
221. Sutkowski, N., et al., *Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP-2A is sufficient for transactivation of the human endogenous retrovirus HERV-K18 superantigen*. J Virol, 2004. **78**(14): p. 7852-60.



222. Klamman, L.D. and D.A. Thorley-Lawson, *Characterization of the CD48 gene demonstrates a positive element that is specific to Epstein-Barr virus-immortalized B-cell lines and contains an essential NF-kappa B site*. J Virol, 1995. **69**(2): p. 871-81.
223. Benit, L., A. Calteau, and T. Heidmann, *Characterization of the low-copy HERV-Fc family: evidence for recent integrations in primates of elements with coding envelope genes*. Virology, 2003. **312**(1): p. 159-68.
224. Patzke, S., et al., *Characterization of a novel human endogenous retrovirus, HERV-H/F, expressed in human leukemia cell lines*. Virology, 2002. **303**(1): p. 164-73.
225. Laska, M.J., K.K. Nissen, and B.A. Nexø, *(Some) cellular mechanisms influencing the transcription of human endogenous retrovirus, HERV-Fc1*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53895.
226. Strissel, P.L., et al., *Reactivation of codogenic endogenous retroviral (ERV) envelope genes in human endometrial carcinoma and prestages: Emergence of new molecular targets*. Oncotarget, 2012. **3**(10): p. 1204-19.
227. Charcot, J.M., *Leçons sur les maladies chroniques du système nerveux. I: Des scléroses de la moelle épinière*. . Gazette Hôpitaux 1868. **41**: p. 405–406, 409.
228. Duperray, A., et al., *Inflammatory response of endothelial cells to a human endogenous retrovirus associated with multiple sclerosis is mediated by TLR4*. Int Immunol, 2015. **27**.
229. Buljevac, D., et al., *Epstein-Barr virus and disease activity in multiple sclerosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2005. **76**(10): p. 1377-81.
230. Martinez, A., et al., *Environment-gene interaction in multiple sclerosis: human herpesvirus 6 and MHC2TA*. Hum Immunol, 2007. **68**(8): p. 685-9.
231. Lin, P.I., et al., *No gene is an island: the flip-flop phenomenon*. Am J Hum Genet, 2007. **80**(3): p. 531-8.
232. Grupo de trabajo de la Guía de práctica clínica sobre la atención a las personas con esclerosis múltiple, AIAQS, and FEM/Cemcat, *Guía de práctica clínica sobre la atención a las personas con esclerosis múltiple*. 2012, Agència d'Informació, Avaluació i Qualitat en Salut. Servei Català de la Salut. Departament de Salut.Generalitat de Catalunya: Barcelona.
233. Karlin, E. and E. Phillips, *Genotyping for severe drug hypersensitivity*. Curr Allergy Asthma Rep, 2014. **14**(3): p. 418.
234. Mastroeni, D., et al., *Reduced RAN expression and disrupted transport between cytoplasm and nucleus; a key event in Alzheimer's disease pathophysiology*. PLoS One, 2013. **8**(1): p. e53349.
235. Nagara, Y., et al., *Impaired cytoplasmic-nuclear transport of hypoxia-inducible factor-1alpha in amyotrophic lateral sclerosis*. Brain Pathol, 2013. **23**(5): p. 534-46.
236. Ortega-Madueno, I., et al., *Anti-human herpesvirus 6A/B IgG correlates with relapses and progression in multiple sclerosis*. PLoS One, 2014. **9**(8): p. e104836.
237. Simpson, S., Jr., et al., *Anti-HHV-6 IgG titer significantly predicts subsequent relapse risk in multiple sclerosis*. Mult Scler, 2012. **18**(6): p. 799-806.

